

Санкт-Петербургский государственный университет

Рагозина Евгения Алексеевна

Распределение активных зон в нервно-мышечном синапсе личинки
Drosophila melanogaster при экспрессии гена *APP* человека

Выпускная квалификационная работа
по направлению подготовки 06.04.01 «Биология»
основная образовательная программа магистратуры «Биология»
профиль "Физиология, биохимия, биофизика"

Работа выполнена на кафедре
Общей физиологии

Научный руководитель:
профессор кафедры Общей физиологии,
доктор биологических наук, И.И. Кривой

Санкт-Петербург

2018

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Белок предшественник амилоида и его функции.....	6
1.1.1. Семейство белка предшественника амилоида (Amyloid Precursor Protein, APP)	6
1.1.2. Структура APP	9
1.1.3. Процессинг APP	11
1.1.4. Физиологическая роль APP.....	13
1.2. β -амилоид	16
1.2.1. Общие сведения о β -амилоиде	16
1.2.2. Физиологическая роль $A\beta$	18
1.2.3. Патофизиологические эффекты $A\beta$	19
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> как модельный объект.....	22
1.3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> как модель для исследования влияния APP на распределение активных зон	22
1.3.2. Краткая характеристика мышечной системы <i>Drosophila melanogaster</i>	23
1.3.3. Строение нервно-мышечного синапса личинки дрозофилы.....	27
1.3.4. Строение активных зон.....	30
1.3.5. Механизм экзоцитоза синаптических везикул	37
1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	39
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Характеристика экспериментального объекта	40
2.2. Приготовление нервно-мышечного препарата личинки <i>Drosophila melanogaster</i> , характеристика экспериментальных условий и растворы.....	41
2.3. Антитела и иммуногистохимия	42
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
4. ВЫВОДЫ	63
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	64

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APP – Amyloid precursor protein (предшественник амилоидного белка);

A β – β -амилоид;

BACE – β -site APP-cleaving enzyme (β -секретаза человека);

APLP1 – APP like protein 1 (белок, подобный белку предшественнику амилоида 1)

APLP2 – APP like protein 2 (белок, подобный белку предшественнику амилоида 2)

Appl – amyloid precursor protein-like protein (белок, подобный белку предшественнику амилоида)

APL-1 – amyloid protein-like protein 1 (белок, подобный амилоидному белку 1)

Brp – Bruchpilot

A3 – активная зона

Syt-1 – синаптотагмин-1

ВВЕДЕНИЕ

Белок предшественник амилоида (APP, amyloid precursor protein) является крупным трансмембранным белком, экспрессируемым в большинстве клеток животных. Долгое время особый интерес у исследователей вызывал только его протеолитический фрагмент (β -амилоид, A β), главный белок амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера (Reinhard et al., 2005). Однако в последние десятилетия увеличился процент работ по изучению функций самого APP. При нарушении экспрессии белка предшественника амилоида может нарушаться синаптическая передача и возможно появление дегенеративных процессов еще до формирования амилоидных бляшек (Masliah et al., 1994; Senechal et al., 2006).

В настоящее время продолжается исследование функций APP и β -амилоида. Показано, что APP принимает участие в образовании синапсов и регулирует их активность, участвует в процессах памяти и обучения, однако с другой стороны он может вызывать нарушения в работе синапсов, в процессах памяти и обучения (Senechal et al., 2006; Ting et al., 2007; Mhatre et al., 2014).

Изучение функций белка предшественника амилоида необходимо для более полного понимания его физиологических и патофизиологических эффектов. Для исследования роли APP и его протеолитического продукта β -амилоида создано множество модельных организмов, в том числе млекопитающие, нематоды, рыбы Данио рерио, дрозофила. Главным минусом использования млекопитающих для данных исследований является невозможность изучения эффекта этих белков независимо друг от друга. В связи с этим наиболее удобной моделью является *Drosophila melanogaster*, поскольку у нее нет генов APP и β -секретазы, соответственно, не происходит образование APP и β -амилоида, что позволяет разделить эффекты этих белков (Chakraborty et al., 2011; Mhatre et al., 2014). Важно отметить, что удобство использования дрозофилы связано с тем, что и нервно-мышечный синапс *Drosophila melanogaster*, и синапсы ЦНС млекопитающих являются глутаматергическими (Collins, DiAntonio, 2007).

При экспрессии гена APP человека у дрозофилы наблюдалась нейродегенерация, нарушались процессы обучения и памяти, локомоторное поведение. Белок предшественник амилоида независимо от β -амилоида изменяет морфологию нервного окончания в нервно-мышечной системе личинки *Drosophila melanogaster*, увеличивая число ветвлений и количество синаптических бутонов. Кроме того, для APP независимо от эффектов β -амилоида показано нарушение экзоцитоза синаптических везикул, которое проявлялось в снижении частоты спонтанной квантовой секреции медиатора (Саранцева и

др., 2012; Сабурова и др. 2015; Mhatre et al., 2014). Процесс экзоцитоза синаптических везикул происходит в пресинаптической активной зоне, где расположены белки, участвующие в поддержании и регулировании эффективности синаптической передачи. Активные зоны участвуют в пространственном и временном контроле слияния синаптических везикул, поэтому их распределение является объектом особого внимания (Blunk et al., 2014; Ackermann et al., 2015). Показано, что белок предшественник амилоида располагается в активной зоне и принимает участие во взаимодействии с экзоцитотическими белками, в том числе с синаптотагмином-1 (Kohli et al., 2012). Существует предположение, что главный белок активной зоны дрозофилы - Bruchpilot (Bpr) – является ключевым белком, определяющим вероятность экзоцитоза синаптических везикул. В одном из исследований продемонстрировано его функциональное взаимодействие с синаптотагмином-1, и, как показано, оба этих белка играют важную роль в пространственной дифференциации активных зон (Paul et al., 2015). Активные зоны в методе иммуногистохимического окрашивания определяют по расположению белка Bpr.

На данный момент данные из литературы по β -амилоиду весьма противоречивы. И до конца неизвестно, какие морфофункциональные изменения он вызывает.

В соответствии с имеющимися данными можно предположить, что белок предшественник амилоида может влиять на распределение белка Bruchpilot (следовательно, и активных зон), что может объяснить вызываемое им нарушение процесса экзоцитоза синаптических везикул, которое проявляется в снижении частоты спонтанной квантовой секреции медиатора.

Цель работы: изучение влияния белков APP и A β человека на распределение активных зон в синаптических бутонах нервных окончаний личинки *Drosophila melanogaster* при совместной экспрессии генов APP и β -секретазы и при прямой экспрессии последовательности A β человека.

Задачи: освоить методики препаровки личинки *Drosophila melanogaster*, иммуногистохимического окрашивания двигательных нейронов и активных зон и оценки распределения активных зон в бутонах нервных окончаний у личинок трех линий *Drosophila melanogaster*: контрольной, линии с одновременной экспрессией генов APP и β -секретазы человека, в которой происходит образование и APP, и β -амилоида, и линия с прямой экспрессией последовательности A β человека, где образуется только β -амилоид.

Работа выполнена в рамках НИР, поддержанной грантом Санкт-Петербургского государственного университета № 1.38.231.2014 (рук. проф. А.Г. Марков).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Белок предшественник амилоида и его функции

1.1.1. Семейство белка предшественника амилоида (Amyloid Precursor Protein, APP)

Белок предшественник амилоида (amyloid precursor protein, APP), открытый в конце 80-х годов, относится к эволюционно древнему семейству трансмембранных белков I типа, обнаруженного у всех высших организмов. Открытию APP способствовали исследования амилоидных бляшек, возникающих при болезни Альцгеймера, в середине 80-х годов. Было сделано предположение, что β -амилоид ($A\beta$), входящий в состав бляшек, является производным некоего белка предшественника. С течением времени это предположение получило подтверждение, белок предшественник был назван предшественником амилоидного белка (APP). Несмотря на то, что изначально APP рассматривали исключительно как белок, чьим производным является β -амилоид, последующие исследования показали, что он сам, независимо от функционирования $A\beta$, играет важную роль в жизни клеток (De Strooper, Annaert, 2000).

В конце 80-х годов расшифровали генетическую последовательность APP человека и определили участок, соответствующий последовательности $A\beta$. Кроме того установили, что белок предшественник амилоида – трансмембранный белок, состоящий из 695 аминокислот и подвергающийся ферментативному расщеплению (протеолитическому процессингу) (Kang et al., 1987). В протеолитическом процессинге белка предшественника амилоида могут участвовать α -, β - и γ -секретазы.

Благодаря альтернативному сплайсингу образуются различные изоформы APP: APP 695, APP 770, APP 751, L-APP, APP639 (Dawkins, Small, 2014).

Белок предшественник амилоида человека относится к консервативному семейству мембранных белков. У млекопитающих и у других животных обнаружены белки, схожие с APP (Okado, Okamoto, 1992). У APP относительно большой внеклеточный конец (N – терминальный домен) и короткий внутриклеточный конец (C – терминальный домен) (De Strooper, Annaert, 2000; Reinhard et al., 2005). Синтез и перемещение APP происходит в эндоплазматическом ретикулуме, а его созревание в аппарате Гольджи (Sun et al., 2015).

Членами семейства белков предшественника амилоида у млекопитающих являются APP, APP like protein 1 (APLP1) и APP like protein 2 (APLP2). У *Danio rerio* два варианта APP – это Appa, похожий на изоформу APP770 человека, и Appb, похожий на изоформу APP695 человека (Nicolas, Hassan, 2014). У беспозвоночных обнаружены следующие гомологи APP: у *Caenorhabditis elegans* гомологом APP является amyloid protein-like protein 1 (APL-1) и у *Drosophila melanogaster* это amyloid precursor protein-like protein

(Appl). Стоит подчеркнуть, что у беспозвоночных животных участка β -амилоида, характерного для большинства позвоночных, в структуре белка нет (Zheng, Koo, 2006; Gunawardena, Goldstein, 2001). На рис. 1 представлена доменная структура членов семейства APP у различных организмов.

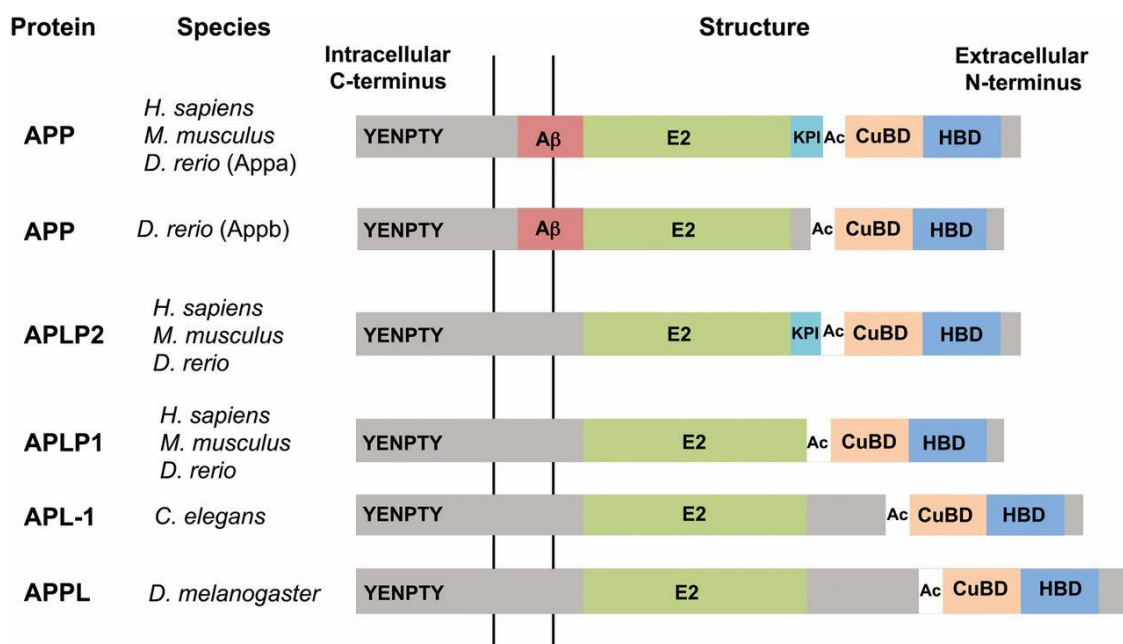


Рис. 1. Доменная структура членов семейства APP у разных организмов (Nicolas, Hassan, 2014).

У всех этих белков имеются консервативные домены во внеклеточных областях и короткий заякоренный цитоплазматический домен с наибольшей степенью гомологии. Гомологи APP у позвоночных имеют большую степень сродства с белком человека, чем гомологи беспозвоночных. Но в это же время *Dr. melanogaster* и *C. elegans* – это наиболее удобные организмы для исследования функций APP *in vivo* (Nicolas, Hassan, 2014).

Домены E2, кислый (Ac) домен, медь-связывающий домен (CuBD) и гепарин-связывающий домен (HBD), расположенные во внеклеточной области белка предшественника амилоида и его гомологов, консервативны для разных видов. В APP и APLP2 имеется домен Кунитц протеазного ингибитора (KPI), подвергающийся альтернативному сплайсингу. Единственным белком, содержащим последовательность β -амилоида, является APP (Nicolas, Hassan, 2014).

У млекопитающих члены семейства белков APP в основном экспрессируются в мозге. Аналогично с APLP1 белок Appl дрозофилы экспрессируется только в нейронах. Несмотря на то, что экспрессия APP и APLP2 ограничивается в основном мозгом, они были обнаружены и в других тканях (Zheng, Koo, 2006).

Геном дрозофилы, в отличие от данио, кодирует только один гомолог APP (Nicolas, Hassan, 2014). App1 дрозофилы примерно на 30% идентичен человеческому APP695, но наибольшая степень консервативности найдена во внеклеточных доменах E1 и E2 и особенно в С-терминальном внутриклеточном домене AICD. 5 изоформ App1 были описаны у дрозофилы с длиной от 830 до 890 аминокислотных остатков, но неизвестно, отличаются ли эти изоформы функционально. В противоположность APP человека, который экспрессируется не только в нейрональных клетках, App1 экспрессируется только в нейронах, начиная с 13 стадии эмбриогенеза дрозофилы. Интересно, что в App1 отсутствует домен Кунитц протеазного ингибитора и тем самым он более близок к APP 695, чем к другим изоформам. Как и APP, App1 подвергается протеолитическому процессингу с помощью нескольких секретаз. Однако, по сравнению с APP, сайты расщепления для α - и β -секретаз реверсированы в App1 (для β -секретазы более проксимальный к трансмембранному региону, а для α -секретазы более дистальный). Эволюционная консервативность App1 и его процессинга не только предполагает, что эти белки имеют важную физиологическую функцию, но также, что исследования на дрозофиле могут обеспечить понимание нормальных функций APP человека и его протеолитических фрагментов (Cassar, Kretzschmar, 2016).

При мутации гена *App1* не происходит развитие нейродегенерации, однако при его удалении у дрозофилы может появляться дефект фототаксиса, хотя морфологических отклонений и снижения жизнеспособности не обнаруживается (Hirth, 2010).

У дрозофилы присутствует ортолог β -секретазы человека – dBACE, имеющий примерно 50% сходство последовательности с β -секретазой человека. Показано, что сдвиг протеолитического процессинга App1 в сторону расщепления β -секретазой может серьезно нарушать циркадианные ритмы и приводить к уменьшению экспрессии циркадианного белка PER. Однако предполагается, что нарушение ритмов поведения связано с общим для α - и β -расщепления механизмом. Кроме того, увеличение производства эндогенного амилоидного внутриклеточного домена *Drosophila* (dAICD) вызывает нарушение циркадианных ритмов, в то время как у мух со сверхэкспрессией App1 наблюдалось сохранение циркадианных ритмов при старении (Bolkan et al., 2012; Blake et al., 2015)

Установлено, что внеклеточный N – терминальный домен может функционировать как рецептор на поверхности клетки, а также способствовать клеточной адгезии. А внутриклеточный С – терминальный домен может оказывать влияние на белок-белковые взаимодействия, таким образом принимая участие в клеточном сигналинге, в том числе, может участвовать в апоптозе клеток (Zheng, Koo, 2006). Кроме того, существует

предположение, что белок предшественник амилоида необходим для сборки нервно-мышечного синапса и центрального синаптогенеза (Guo et al., 2012). APP – широко экспрессируемый трансмембранный белок, расщепляющийся с образованием β -амилоида, и играющий центральную роль в патогенезе болезни Альцгеймера (Senechal et al., 2006). Таким образом, исследования различных видов животных свидетельствуют о консервативности функций членов семейства белка предшественника амилоида, учитывая вклад APP в клеточную адгезию, миграцию нейронов и синаптогенез (Guo et al., 2012). С накоплением данных о функциях APP, его роль в функционировании клетки становится все более важной.

1.1.2. Структура APP

Ген APP располагается на 21 хромосоме, включает в себя 19 экзонов, из них 7, 8 и 15 экзоны подвергаются альтернативному сплайсингу. Изоформы APP, содержащие от 365 до 770 аминокислотных остатков, образуются благодаря альтернативному сплайсингу. Три основные изоформы (APP695, APP751 и APP770) содержат 695, 751 и 770 аминокислот соответственно (рис. 2). Экзон 7 кодирует домен Кунитц протеазного ингибитора, обнаруженного только в изоформах APP751 и APP770. Экспрессия этих двух изоформ ограничена глией и эндотелиальными клетками. Делеция экзонов 7 и 8 приводит к образованию изоформы APP696, экспрессия которой наблюдается в основном в нейронах. Существуют и менее распространенные изоформы APP, например, L-APP. Изоформы с делецией экзона 15, L-APP, экспрессируются в глиальных клетках, лейкоцитах, но не в нейронах. Эти изоформы имеют важное значение в активности иммунокомпетентных клеток.

Тот факт, что члены семейства белка предшественника амилоида обнаружены у разных организмов, а также в разных тканях, имеют высокую степень гомологии последовательности генов, позволяет предположить, что APP играет важную роль, являющуюся общей для различных тканей и организмов (De Strooper, Annaert, 2000; Zheng, Koo, 2006; Bignante et al., 2013; Dawkins, Small, 2014).

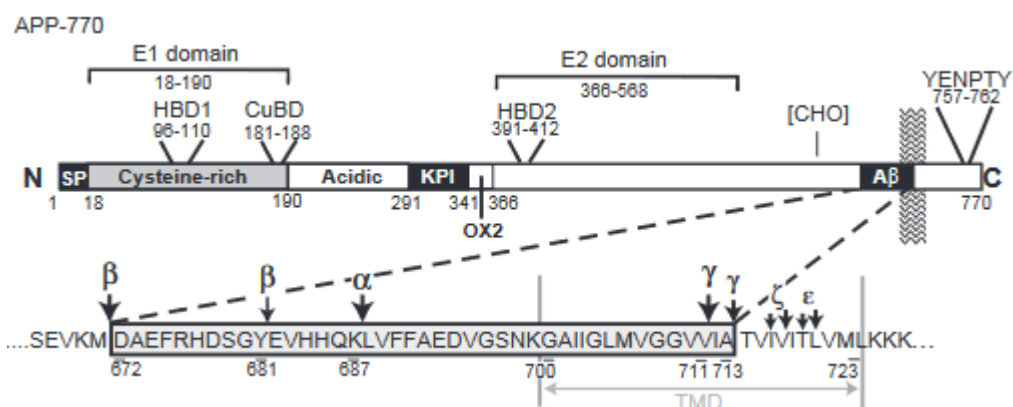


Рис. 2. Доменная структура белка предшественника амилоида. APP имеет N-концевой сигнальный пептид (SP). Домен E1 имеет гепарин-связывающий домен (HBD1) и медь-связывающий домен (CuBD); домен E2 содержит второй домен, связывающий гепарин (HBD2). APP751 и APP770 содержат Кунитц протеазный ингибитор (KPI) и домен антигена Ох-2. Между E2 и Aβ - два потенциальных сайта N-гликозилирования (CHO). В этом регионе также имеется потенциальный сайт присоединения хондроитинсульфата, который образуется при сплайсинге экзона 15. Показана аминокислотная последовательность области Aβ, а также сайты расщепления секретазами. Внутриклеточный C-терминальный домен содержит YENPTY-мотив. TMD, трансмембранный домен (Dawkins, Small, 2014).

Члены семейства APP являются трансмембранными белками, которые пересекают клеточную мембрану один раз. В структуре белка предшественника амилоида можно выделить следующие домены: внеклеточный (N-терминальный), трансмембранный и внутриклеточный (C-терминальный) домены. Относительно короткий внутриклеточный домен содержит C-конец, имеющий несколько сайтов фосфорилирования и YENPTY связывающий мотив, который может взаимодействовать со множеством белков (Nguyen, 2015). Мотив YENPTY участвует в клатрин-опосредованном эндоцитозе и в связывании множества различных белков. Кроме того, этот мотив довольно консервативен и был обнаружен даже у аскариды. Внеклеточный N-терминальный домен включает в себя последовательность сигнального пептида (SP), цистеин-богатый домен (CRD), кислый Asp/Glu-богатый домен (Acid), Кунитц протеазный ингибитор (KPI), Ох-2 и RERMS последовательности, кроме того сайты связывания для меди и цинка. RERMS, KPI и Ох стимулируют рост домена (Selkoe, 2001; Senechal et al., 2006).

RERMS-содержащие пептиды APP также способствовали выживаемости нейронов в клетках первичной коры крысы (Pawlik et al., 2007). Аминокислотный пептид из 17 аминокислот (APP319-335), который содержит последовательность RERMS, может

стимулировать рост фибробластов и усиливать продукцию sAPP α в нейронах. Сам пептид RERMS (APP 328-332) обладает аналогичной активностью, хотя и с пониженной в 10 раз эффективностью. Механизм, посредством которого пептид RERMS усиливает образование sAPP α , неизвестен, хотя данные свидетельствуют о том, что пептид RERMS связывается с рецепторами клеточной поверхности (Libeu et al., 2012).

Предполагается, что KPI может ингибировать сериновые протеазы, а также играть важную роль в димеризации APP. Кроме того, обнаружено, что клетки, экспрессирующие APP с и без домена KPI (APP751 и APP695 соответственно) имеют различную восприимчивость к расщеплению α - и β -секретазами, влияя таким образом на продукцию A β (Ben Khalifa et al., 2012; Chua et al., 2013).

Область Ох-2 представляет собой вставку из 19 аминокислотных остатков, которая похожа на область антигена Ох-2. Антиген Ох-2 является лимфоидным и нейронным гликопротеином клеточной поверхности, который имеет гомологию с тимоцитарным антигеном 1 (Thy-1) и с легкими цепями иммуноглобулина. Функция домена Ох-2 в APP неизвестна, однако петледоменная структура иммуноглобулина обычно встречается в рецепторах клеточной поверхности и участвует в связывании и распознавании клеточной поверхности, и представляется вероятным, что домен Ох-2 в APP имеет аналогичную функцию (Nguyen et al., 2017).

1.1.3. Процессинг APP

APP подвергается протеолитическому процессингу тремя секретазами – α , β и γ . Внеклеточный домен белка предшественника амилоида расщепляется с помощью α - и β -секретаз, в то время как γ -секретаза расщепляет цитоплазматический домен. APP может быть расщеплен двумя путями: неамилоидным и амилоидным. В неамилоидном процессинге APP последовательно расщепляется α - и γ -секретазами. Расщепление α -секретазой происходит внутри последовательности A β , исключая таким образом возможность образования β -амилоида, с высвобождением длинного внеклеточного домена sAPP- α (soluble APP α) и связанного с мембраной C-терминального фрагмента, состоящего из 83 аминокислот (C83 или α -CTF). Далее происходит расщепление фрагмента α -CTF γ -секретазой с высвобождением внеклеточного пептида p3 и внутриклеточного домена AICD, которые впоследствии быстро деградируют (Саранцева и др., 2012; De Strooper, Annaert, 2000; Zheng, Koo, 2006; Zhang et al., 2012; Zuo et al., 2015).

При протеолитическом процессинге по амилоидному пути, APP в первую очередь расщепляется β -сайт APP разрезающим ферментом (β -секретаза, BACE) в

последовательности $A\beta$ по первому (β -сайт) или по одиннадцатому (β' -сайт) аминокислотному остатку, высвобождая $sAPP-\beta$ и связанный с мембраной C-терминальный фрагмент (CTF), который состоит из 99 аминокислот (β -CTF или C99). Далее γ -секретаза расщепляет C99 с высвобождением внутриклеточного домена AICD и амилоидогенного пептида $A\beta$, который агрегирует и формирует амилоидные бляшки в мозгу (De Strooper, Annaert, 2000; Zhang et al., 2012).

Амилоидный и неамилоидный механизмы протеолитического процессинга показаны на рис. 3.

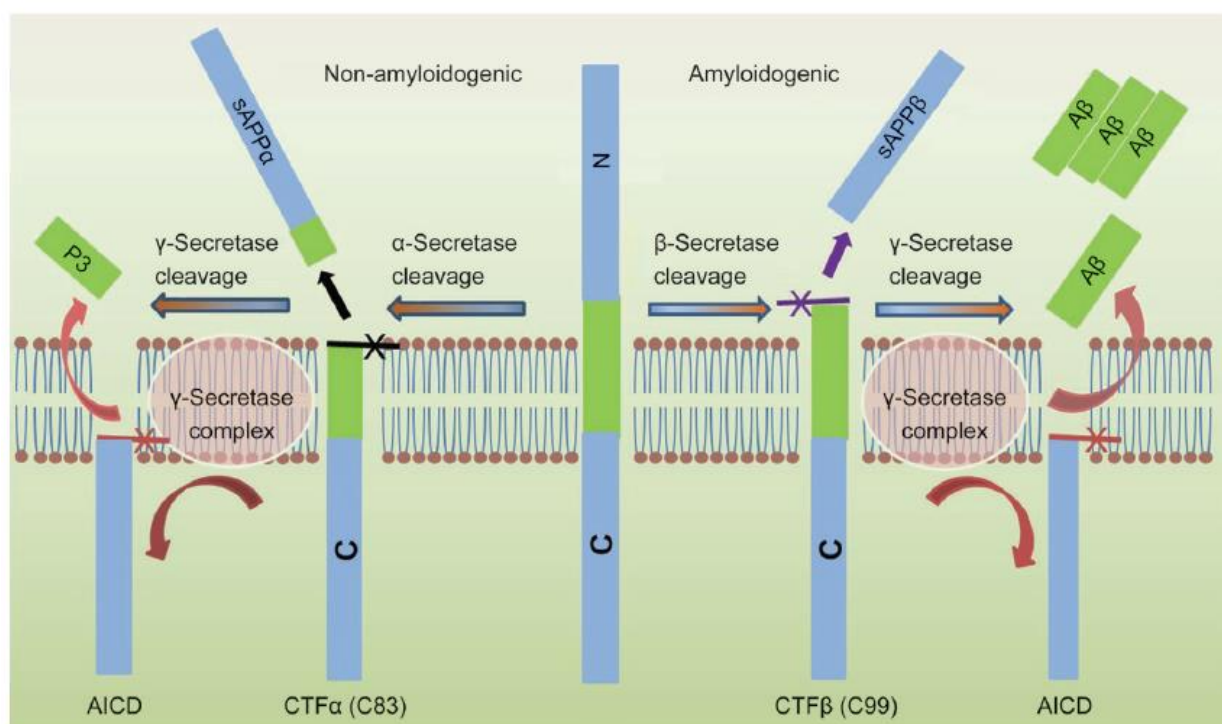


Рис. 3. Справа – амилоидный путь процессинга APP, при участии β - и γ -секретаз, слева – неамилоидный путь расщепления APP, при участии α - и γ -секретаз (Chen et al., 2017).

Различные протеолитические фрагменты могут оказывать трофические и/или токсические эффекты. При нормальных физиологических условиях $sAPP-\alpha$ благоприятно влияет на функции памяти, а также демонстрирует трофические свойства, тогда как при его избытке возможен канцерогенез. $sAPP-\beta$ также имеет нейротрофические свойства, однако по сравнению с $sAPP-\alpha$ его эффективность сильно снижена. Фрагмент p3 был обнаружен в амилоидных бляшках, а также в преамилоидных отложениях в мозжечке у больных с синдромом Дауна. Показано, что p3 имеет нейротоксическую активность, способен индуцировать апоптоз в культивируемых клетках и совместно с пептидом $A\beta$

стимулировать воспалительные реакции в различных типах клеток (линия клеток микроглии MG7, линии астроцитов мыши и человека D30 и U373 и т.д.) путем продуцирования провоспалительных цитокинов. По имеющимся данным, фрагменты CTF α и CTF β являются нейротоксичными, причем фрагмент CTF β является более токсичным, однако неясно, связана ли эта токсичность с самим CTF β или же с фрагментами, которые получаются при его расщеплении (A β или AICD). Помимо нейротоксичности, CTF α и CTF β также нарушают активность калиевых и кальциевых каналов, способствуют генерации свободных радикалов и воспалению (Nhan et al., 2015).

Короткий внутриклеточный домен AICD, высвобождающийся во время протеолитического процессинга белка предшественника амилоида, предположительно участвует в активации сигнальной транскрипции в ядре. При сверхэкспрессии *in vitro* и *in vivo* AICD может индуцировать апоптоз (Reinhard et al., 2005; Senechal et al., 2006; Nhan et al., 2015).

Обычно в организме происходит образование и р3, и A β . Однако в случае мутаций в генах пресенилин-1 (*PSEN1*), пресенилин-2 (*PSEN2*) или *APP* происходит сдвиг протеолитического процессинга в сторону амилоидного пути с большим образованием β -амилоида, что в дальнейшем приводит к развитию патологий (Reinhard et al., 2005; Zheng, Koo, 2006).

1.1.4. Физиологическая роль APP

Хотя к нашему времени было проведено множество исследований, однако физиологические функции и токсические эффекты самого белка предшественника амилоида и его гомологов остаются неясными. Предположительно, APP может участвовать в формировании синапсов и регулировать их активность, кроме того, имеет немаловажное значение в процессах памяти и обучения (Tuan et al., 2012). Известно, что APP играет важную роль в росте нейронов и их созревании во время развития мозга, возможно влияя на пролиферацию и на нейрогенез нервных стволовых клеток (Coronel et al., 2018).

Недавно было показано, что у взрослых особей мышей в головном мозге функция APP заключается в регуляции пролиферации клеток-предшественников нейронов и разрастании аксонов после травмы. Было высказано предположение о нейрогенной и нейрорегенеративной роли APP в ткани головного мозга, хотя клеточный и молекулярный механизмы, с помощью которого APP регулирует эти процессы, остаются неясными. Кроме того, в эмбриональной стадии APP экспрессируется на ранних этапах развития

нервной системы, что указывает на важную роль этого белка в росте нейронов и их созревании. Белок предшественник амилоида может играть роль трофического фактора, вовлеченного в рост нейритов и синаптогенез, способствовать миграции нейронов и нейрогенезу как *in vitro*, так и *in vivo*. (Coronel et al., 2018).

APP был найден в мембране синаптических везикул, где он связывается с синаптотагмином – кальциевым сенсором при экзоцитозе – с помощью своего внеклеточного домена, что говорит о том, что белок предшественник амилоида имеет важное значение в процессе экзоцитоза синаптических везикул (Kohli et al., 2012).

Экспрессия белка предшественника амилоида может приводить к серьезным функциональным и морфологическим изменениям в нервно-мышечных соединениях, которые заключаются в разрастании аксонов, увеличении числа синаптических бутонов, нарушении экзоцитоза синаптических везикул, уменьшении количества митохондрий в пресинаптических терминалях. Кроме того, существует предположение, что повышение экспрессии APP может приводить к патологии синапсов отдельно от нейротоксических эффектов β -амилоида (Саранцева и др., 2012; Tyan et al., 2012).

Некоторые фрагменты, образующиеся при протеолитическом процессинге APP, являются нейротоксичными, однако некоторые из них могут оказывать нейропротекторное действие. APP был обнаружен в различных нейрональных структурах, среди которых синаптические везикулы, тела и поверхности нейронов, аксоны и дендриты (Gunawardena, Goldstein, 2001; Nhan et al., 2015). Белок предшественник амилоида может подвергаться посттрансляционной модификации, в том числе гликозилированию, фосфорилированию, сиаилированию и сульфатированию тирозина, а кроме того, разным видам протеолитического процессинга с созданием пептидных фрагментов (Joshi et al., 2015).

В некоторых работах было показано, что изменение уровня белка предшественника амилоида может вызывать дисфункцию синапсов, ухудшать процессы обучения и памяти и приводить к различным нарушениям (Seabrook et al., 1999; Senechal et al., 2006; Ting et al., 2007; Mhatre et al., 2014).

Существует предположение, что члены семейства белка предшественника амилоида могут принимать участие во взаимодействиях клетка-клетка и клетка-субстрат. Во внеклеточной части APP содержится несколько структурных доменов, к которым был обнаружен ряд предполагаемых физиологических лигандов для APP. Часть лигандов относятся к компонентам внеклеточного матрикса и к белкам клеточной адгезии, в том числе ламинин, коллаген первого типа, рилин, нетрин и т.д. В зависимости от того, с

какой структурой свяжется APP, может изменяться его распределение в клетке и/или обработка секретазами. В ряде случаев может происходить сдвиг в сторону неамилоидного пути протеолитического процессинга APP и снижение образования β -амилоида (Bignante et al., 2013).

Для внеклеточного и внутриклеточного доменов APP показаны различные функции, в том числе предполагается, что внеклеточный домен может служить рецептором на клеточной поверхности (Zheng, Koo, 2006). Кроме того, APP может участвовать в клеточной адгезии, способствовать аксональному росту и синаптогенезу (Zheng, Koo, 2006). Например, межклеточная адгезия может осуществляться с помощью ассоциированных с мембраной APP, APPL1 и APPL2 путём гомо- и гетеродимеризации (Bignante et al., 2013). Для внутриклеточного домена, в свою очередь, показано множество функций, в которых он принимает участие, в том числе это фосфорилирование, белок-белковые взаимодействия, клеточный сигналинг, апоптоз клеток, аксональный транспорт, участие в миграции клеток, синаптическом ремодулировании и в процессе эндоцитоза (Zheng, Koo, 2006).

На данный момент идёт активное обсуждение роли APP в патогенезе болезни Альцгеймера. До сих пор о механизме гибели нейронов и нарушении синаптической передачи известно немного. Большинство исследователей связывает нарушение функционирования синапсов с накоплением А β . Однако показано, что еще до образования амилоидных бляшек, нейрофибриллярных сплетений и гибели нейронов происходит нарушение памяти, которое начинается в одно время с дисфункцией синапсов (Саранцева и др., 2012; Masliach et al., 1994). Соответственно, о нарушении синаптической передачи можно говорить ещё до появления амилоидных бляшек. Предполагается, что синаптическая дисфункция при болезни Альцгеймера связана с мутацией в гене *APP*, продуцирующем белок предшественник амилоида (Torroja et al., 1999).

При гиперэкспрессии, нокауте и нокдауне APP у мышей были показаны различные синаптические дисфункции. В опытах на трансгенных мышах с гиперэкспрессией APP было показано увеличение числа синапсов в корковых областях, а кроме того, отмечалось нарушение синаптической передачи, проявлявшееся в уменьшении амплитуды и частоты спонтанных одноквантовых постсинаптических ответов (Ting et al., 2007; Bignante et al., 2013). При нокауте гена *APP* у мышей наблюдалось снижение двигательной активности, нарушение процессов обучения и памяти. Кроме того, у мышей с нокаутом и нокдауном по гену *APP* отмечалась дисфункция синапсов, проявляющаяся в том, что нарушается долговременная потенция и уменьшается количество ветвлений в нейронах

гиппокампа и, соответственно, происходит уменьшение плотности дендритных шипиков (Tyan et al., 2012).

Экспрессия гена *APP* человека у личинок *Dr. melanogaster* приводила к морфологическим и функциональным нарушениям: изменялась длина и число ветвлений нервного окончания, количество синаптических бутонов и нарушался процесс экзоцитоза (Саранцева и др., 2012; Mhatre et al., 2014). Нарушение процесса экзоцитоза при экспрессии гена *APP*, а также при совместной экспрессии генов *APP* и β -секретазы, проявлялось в снижении частоты спонтанной квантовой секреции медиатора (Сабурова и др. 2015).

В настоящий момент имеются данные о том, что APP находится в пресинаптической активной зоне, где он может совместно со множеством других белков участвовать в процессе экзоцитоза синаптической везикулы за счёт связывания с белками экзоцитоза. Кроме того, APP непосредственно взаимодействует с некоторыми белками синаптических везикул, включая dynamin-1, Munc18, NSF, синаптотагмин-1 и образует комплексы с белками активных зон Mint1, CASK и bassoon (Laßek et al., 2013).

1.2. β -амилоид

1.2.1. Общие сведения о β -амилоиде

В процессе протеолитического расщепления белка предшественника амилоида β - и γ -секретазами происходит образование β -амилоида (A β). В состав β -амилоида входит от 38 до 42 аминокислотных остатков (Мухамедьяров, Зефилов, 2013; Reinhard et al., 2005; Senechal et al., 2006). β -амилоид состоит из отрицательно заряженного домена на N-конце и гидрофобного домена на C-конце. Во время протеолитического процессинга при разрезании γ -секретазой C-конца β -амилоида образуются 3 основные изоформы: A β 38, A β 40 и A β 42 (Lucey, Bateman, 2014).

β -амилоид является физиологическим пептидом, он был обнаружен в разных биологических жидкостях и тканях головного мозга человека в норме в пикомолярных концентрациях. Поскольку протеолитический процессинг – это физиологический процесс, то лишь при повышении концентрации A β (избыточной продукции или накоплении) могут возникать различные нейродегенеративные патологии, в том числе и болезнь Альцгеймера (Мухамедьяров, Зефилов, 2013; Pearson, Peers, 2006).

β -амилоид имеет β -складчатую укладку полипептидной цепи, из-за которой он и получил свою приставку « β ». Обнаружены две формы A β : растворимая и нерастворимая. Олигомеры, содержащие 2-6 пептидов, являются растворимыми формами, тогда как

полимеры, которые содержат больше 6 пептидов, относятся к нерастворимым (Мухамедьяров, Зефилов, 2013).

Изначально, интерес к А β возник именно в связи с тем, что он является главным компонентом амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера. Кроме того, внеклеточные отложения А β характерны для нескольких неврологических состояний, включая: болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, черепно-мозговые травмы и старение (Cárdenas-Aguayo et al., 2014).

Долгое время считалось, что нерастворимые формы β -амилоида, образующие амилоидные (сенильные) бляшки, являются более нейротоксичными. В настоящее время имеются противоположные данные: как показано, олигомеры (димеры, тримеры и т.д.), являющиеся растворимыми формами А β , имеют большую нейротоксичность. У большинства модельных животных при повышении уровня экспрессии β -амилоида и накоплении олигомеров А β может возникать синаптическая недостаточность и когнитивные нарушения. При болезни Альцгеймера отмечена корреляция тяжести когнитивных нарушений с количеством растворимого А β , в то время как нерастворимые формы могут играть роль депо, из которых с течением времени возможно формирование токсичных форм растворимого β -амилоида (Мухамедьяров, Зефилов, 2013; Querfurth, LaFerla, 2010; Fang et al., 2012).

β -амилоид может спонтанно самоагрегироваться с образованием соединений (форм), содержащих различное количество пептидов. Олигомеры могут соединяться в промежуточные агрегаты. Также из А β могут образовываться фибриллы, выстраивающиеся в β -лист с формированием нерастворимых волокон сенильных бляшек.

Олигомеризация β -амилоида зависит от разных факторов, в том числе от pH, ионной силы растворителя, температуры, концентрации А β , взаимодействия А β с ионами металла и так далее (Davis, Berkowitz, 2009; Querfurth, LaFerla, 2010).

Среди агрегатов А β выделяют три группы (по длине, молекулярной массе и микроскопическим размерам): первая группа представлена очень короткими олигомерами (димерными и гексамерными формами А β), ко второй группе относятся небольшие олигомеры, имеющие молекулярную массу 17-42 кДа, третья группа включает в себя протофибриллы, или префибриллярные агрегаты, которые являются переходными структурами, появляющимися до образования зрелых амилоидных фибрилл. К наиболее нейротоксическим формам А β относятся растворимые олигомеры и промежуточные амилоиды. Показано, что димеры и тримеры β -амилоида могут быть токсичными для синапсов. Кроме того, при болезни Альцгеймера обнаружена корреляция между тяжестью

когнитивного дефекта и количеством олигомеров в головном мозге, а не с общим уровнем β -амилоида (Querfurth, LaFerla, 2010; Sadigh-Eteghad et al., 2015).

По имеющимся данным, $A\beta_{1-40}$ может образовывать 3_{10} -спираль в растворе, что может означать возможность перехода от спирали к β -складчатому слою. 3_{10} -спираль является вторичной структурой белков, в которой в одном витке содержится 3 аминокислоты. Кроме того, 3_{10} -спираль более закрученная относительно более распространенной α -спирали (Kotler et al., 2014).

1.2.2. Физиологическая роль $A\beta$

Как было показано в последние годы, очень низкие концентрации (10^{-7} М и меньше) мономерных форм $A\beta$ могут играть роль в физиологических функциях в возбудимых тканях. Мономерная форма β -амилоида может регулировать синаптическую передачу и пластичность за счет угнетения синаптической активности, что необходимо для пластичности синаптической функции и осуществления отрицательной обратной связи. Показано, что мономерная форма $A\beta$ имеет нейропротекторные свойства и является важным звеном в нормальном функционировании и выживании нейронов (Мухамедьяров, Зефилов, 2013).

В ряде исследований показано, что растворимые олигомеры β -амилоида могут связываться с возбуждающими синапсами, а также с дендритами и аксонами, причем связывание олигомеров с последними менее крепкое по сравнению с дендритами. Связывание с аксонами может играть роль в ингибировании быстрого аксонального транспорта, которое индуцировано растворимыми олигомерами β -амилоида (Ferreira et al., 2015).

Олигомеры β -амилоида и амилоидные олигомеры в целом могут связывать общие антитела, что может указывать на общую структуру амилоидных олигомеров, характерных для разных болезней и белковых последовательностей (Kotler et al., 2014). Кроме того, $A\beta$ может играть роль антиоксиданта: β -амилоид может снижать окислительные повреждения за счет задерживания металлов в своих сайтах связывания с металлами (Carrillo-Mora et al., 2014).

В первоначальных электрофизиологических исследованиях срезов гиппокампа показано, что в наномолярных концентрациях (100-200 нМ) β -амилоид может принимать участие в улучшении долговременной синаптической пластичности (Carrillo-Mora et al., 2014).

1.2.3. Патофизиологические эффекты A β

При повышении концентрации A β могут возникать различные патологии. Уровень β -амилоида может изменяться из-за нарушения работы секретаз, участвующих в протеолитическом расщеплении белка предшественника амилоида или из-за мутаций в гене *APP*. В этих случаях может происходить сдвиг протеолитического процессинга в сторону амилоидного пути с большим образованием β -амилоида, что может отражаться в повышенном уровне растворимых олигомеров A β , а также его нерастворимых форм. Эти изменения могут приводить к разным нарушениям, связанным главным образом с функционированием нейронов.

Показано, что растворимая форма A β может вызывать разные нейротоксические эффекты, которые проявляются в нарушении синаптической передачи и пластичности, синаптической и митохондриальной дисфункции, дезорганизации плазматической мембраны клетки, изменении частоты спонтанной квантовой секреции и изменении амплитуды постсинаптических миниатюрных ответов. Однако в зависимости от особенностей исследуемых объектов и типа используемого β -амилоида (количество аминокислот) получены противоречивые данные по амплитуде и частоте (Мухамедьяров, Зефирова, 2013; Querfurth, LaFerla, 2010).

Пикомолярные концентрации A β могут усиливать синаптическую пластичность и спонтанную внутриклеточную передачу кальциевых сигналов. Таким образом, по некоторым данным очень низкие (пикомолярные) концентрации растворимых олигомеров A β могут играть важную роль в правильном функционировании синапсов, однако при повышении уровня растворимых олигомеров β -амилоида наблюдалось ухудшение синаптической пластичности из-за ингибирования долговременной потенциации (Carrillo-Mora et al., 2014; Lee et al., 2014; Ferreira et al., 2015).

Изоформа A β 42 нерастворима и считается более цитотоксичной, чем растворимая изоформа A β 40, и она имеет более высокую склонность к агрегации и образованию амилоидных фибрилл. При некоторых мутациях в *APP* в культивируемых клетках происходило увеличение уровня A β 42, тогда как для дикого типа *APP* характерно преимущественно формирование изоформы A β 40. Показано, что в нормальных физиологических условиях около 90% β -амилоида представлено изоформой A β 40 и меньше 5% изоформой A β 42 (Vattemi et al., 2009; Hamley, 2012; Sun et al., 2015). Изоформа A β 42 может агрегировать быстрее A β 40 и образовывать стабильные олигомеры β -амилоида (димеры и/или тетрамеры). Обе эти изоформы β -амилоида могут нарушать долговременную потенциацию в нейронах. В опытах на *Drosophila* показано, что при

избыточной экспрессии A β 42 может существенно снижаться холинергическая синаптическая передача в проекционных нейронах в обонятельной доле, наблюдались нарушения кратковременной памяти и преждевременная смерть (Fang et al., 2012).

При дисбалансе между продукцией и удалением A β происходит его накопление и агрегация во внеклеточном пространстве, что может способствовать развитию болезни Альцгеймера. «Амилоидная гипотеза» является одной из наиболее активно обсуждаемых гипотез, которая объясняет причины возникновения основных клинических симптомов при болезни Альцгеймера. Гипотеза амилоидного каскада гласит, что нейродегенерация при болезни Альцгеймера вызвана аномальным накоплением β -амилоидных бляшек в различных областях мозга. A β накапливается во внеклеточном пространстве и может агрегировать с другими β -амилоидами, формируя, таким образом, амилоидные или сенильные бляшки. Нейротоксин, который выделяется этими бляшками, воздействует на нейроны, разрушая цитоскелет, что может приводить к гибели клеток. Цитоскелет клетки разрушается из-за гиперфосфорилирования цитоскелетного белка tau (Querfurth, LaFerla, 2010).

Установлено, что β -амилоид может накапливаться не только во внеклеточном пространстве с последующим формированием амилоидных бляшек, но и внутри клетки, где он может нарушать строение клетки и влиять на ее функционирование. Присутствие β -амилоида в нейронах связано с его внутриклеточной продукцией и захватом A β при эндоцитозе из внеклеточного пространства. Внутриклеточное накопление A β происходит главным образом в мультивезикулярных тельцах и лизосомах, но также в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и в цитозоле, где оно может влиять на функцию протеасомы (Bayer, Wirths, 2010; Hamley, 2012).

При некоторых нейродегенеративных заболеваниях нарушается регуляция кальция. Изоформа A β 42 содержит уникальные структурные особенности, которые могут облегчать его встраивание в мембрану и формирование потенциал-независимых катионных каналов для кальция, что приводит к входу кальция в клетку и к деградации нейрона. Повышение концентрации Ca²⁺ в цитозоле при болезни Альцгеймера может стимулировать агрегацию β -амилоида и амилоидогенез. Кроме того, при повышении уровня A β 42 происходит увеличение запаса Ca²⁺ в эндоплазматическом ретикулуме и его высвобождение в цитоплазму (Querfurth, LaFerla, 2010; Ullah et al., 2015; Bode et al., 2016).

Предполагается, что при болезни Альцгеймера возможно связывание внеклеточных растворимых олигомеров β -амилоида с плазматической мембраной, что в свою очередь вызывает внутриклеточные нарушения на пре- и постсинапсе. На

постсинаптической мембране происходит взаимодействие растворимых форм Аβ и рецепторов глутамата, что приводит к нерегулируемому току кальция, который может ухудшать долговременную потенцию и усиливать долгосрочную депрессию. Дендритные шипики связываются с растворимыми формами Аβ, в результате чего происходит уменьшение их плотности и изменение морфологии. Растворимые формы Аβ отрицательно влияют на транспортировку митохондрий и везикул с BDNF, которые необходимы для нормального функционирования нейронов. Митохондрии за счет производства АТФ и буферного синаптического кальция поддерживают нейротрансмиссию в пресинаптических бутонах. Митохондриальная дисфункция, проявляющаяся в снижении продукции АТФ, может возникать под воздействием β-амилоида. В клетке олигомеры Аβ приводят к снижению числа зрелых дендритных шипиков и блокировке аксонального и дендритного транспорта в нейронах (Carrilo-Mora et al., 2014; Umeda et al., 2015; Seifert et al., 2016).

При повышении продукции пептида, нарушении деградации, определенной степени полимеризации Аβ приобретает токсические свойства. Основываясь на взаимодействии растворимых олигомеров β-амилоида и некоторых рецепторов или ко-рецепторов было описано множество нейротоксических эффектов. Существует тесная связь между глутаматными рецепторами и нейротоксическими эффектами растворимых олигомеров β-амилоида. Показано, что растворимые олигомеры Аβ взаимодействуют с ионотропными глутаматными рецепторами AMPA, NMDA и с метаботропным глутаматным рецептором пятого типа. При связывании с нейронами растворимые олигомеры β-амилоида могут вызывать множество аномальных сигнальных путей, эффекты которых проявляются в ненормальном кальциевом сигналинге, окислительном стрессе, тау гиперфосфорилировании, удалении рецепторов из синапсов, которые связаны с пластичностью (AMPA и NMDA-рецепторы), нарушении аксонального транспорта, увеличении высвобождения глутамата из пресинаптических окончаний, повышении уровня D-серина и воспалении (Ferreira et al., 2015).

β-амилоид принимает участие в окислительном стрессе и способствует генерации активных форм кислорода и азота. В амилоидных бляшках происходит накопление редокс-активных ионов меди, которые в дальнейшем связываются с Аβ. Комплекс медь-Аβ способен катализировать образование активных форм кислорода (Cassagnes et al., 2013). Кроме того, агрегация β-амилоида способствует формированию свободных радикалов, быстро вступающих во взаимодействие с рядом фрагментов белков и липидов, которые становятся потенциально «токсичными» окисленными белками и перекисями

липидов. Показано, что при окислении белка может нарушаться целостность мембраны. С другой стороны, окислительный стресс может влиять на образование A β путем взаимодействия с APP, а также опосредованно модулировать активность и уровень ключевых ферментов протеолитического процессинга - β - и γ -секретаз (Yang et al., 2012; Sun et al., 2015).

Митохондрии содержат белок предшественник амилоида и γ -секретазный комплекс, кроме того, было продемонстрировано взаимодействие A β и одного митохондриального белка. Все это служит доказательством образования β -амилоида на митохондриальной мембране. Накопление A β приводит к нарушению функций митохондрий из-за блокировки транслокации некоторых митохондриальных молекул и белков и из-за разрушения электронно-транспортной цепи, что может приводить к повышению продукции β -амилоида и увеличению токсичности. Однако механизмы, с помощью которых происходит транспорт A β и APP в митохондриальной мембране, остаются загадкой (Мухамедьяров, Зефилов, 2013; Sun et al., 2015).

1.3. *Drosophila melanogaster* как модельный объект

1.3.1. *Drosophila melanogaster* как модель для исследования влияния APP на распределение активных зон

Для изучения функций APP и A β существует множество моделей. Среди млекопитающих модельными объектами могут являться собаки, кошки, крысы, мыши и т.д. Используют и другие модели: *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* и *Drosophila melanogaster* (Van Dam, De Deyn, 2011). Поскольку в гомологах APP млекопитающих отсутствует последовательность β -амилоида, то в норме у них не происходит образование A β . Однако у млекопитающих в наличии все секретазы, необходимые для протеолитического процессинга APP (α -, β - и γ -секретазы), таким образом при экспрессии APP человека у них происходит образование A β . По этой причине существующие экспериментальные модели млекопитающих являются далеко не самыми удобными объектами, так как они не позволяют изучать влияние APP и A β отдельно. Одной из наиболее удобных моделей для исследования функций APP и A β является *Drosophila melanogaster*. У дрозофилы отсутствуют β -секретазы и APP, таким образом в трансгенных линиях можно изучать роли A β и APP независимо друг от друга (Саранцева и др., 2012).

У дрозофилы отсутствует APP, однако показано присутствие гена ортолога гена APP человека – *Appl*. Однако белок Appl дрозофилы не имеет последовательности β -амилоида. У *Drosophila melanogaster* обнаружены α - и γ -секретазы. Отличие γ -секретазы

дрозофилы и человека заключается лишь в каталитическом центре, поэтому при экспрессии APP человека может происходить его правильное расщепление (Van Dam, De Deyn, 2011). Однако у дрозифилы нет β -секретазы человека, а только ее функциональный гомолог dBACE, поэтому в опытах с экспрессией гена APP человека β -амилоид не образуется. Соответственно только при совместной экспрессии генов APP и β -секретазы (BACE) человека будет происходить образование β -амилоида. Поэтому на различных трансгенных линиях дрозифилы с экспрессией белков APP и/или A β возможно изучение роли и функции этих белков как независимо друг от друга, так и при одновременной экспрессии (Саранцева и др., 2012; Van Dam, De Deyn, 2011; Prűbing et al., 2013).

Drosophila melanogaster - это чрезвычайно удобная и распространенная модель, используемая для исследования различных биологических процессов. Удобство использования этой модели связано с расшифрованным геномом, исследованной экспрессией и регуляцией генов, а также хорошо изученной анатомией и физиологией. Некоторые гены человека и *Drosophila* обладают удивительным сходством по своей структуре, у дрозифилы обнаружены гены-ортологи, связанные с человеческими болезнями (Hales et al., 2015). Для человека и дрозифилы показано сходство в формировании синапсов, мембранном транспорте и клеточной смерти (Hirth, 2010). Хотя строение нервной системы по сравнению с млекопитающими проще, однако значительные отличия в принципе передачи сигнала и работе нервно-мышечного синапса не обнаружены. Такие аспекты нервно-мышечной передачи, как генерация потенциала действия, перемещение его по нейрону до нервно-мышечного синапса, возбуждение и сокращение мышц, не имеют сильных различий у дрозифилы и млекопитающих. В связи с этим дрозифила чрезвычайно удобная модель для изучения нервно-мышечной передачи. Короткий жизненный цикл дрозифилы удобен для изучения работы белков в различные периоды жизни мухи (Lloyd, Taylor, 2010).

1.3.2. Краткая характеристика мышечной системы *Drosophila melanogaster*

Длина тела личинки составляет 3-4 мм, в нём выделяют 12 сегментов: головной, 3 грудных и 8 брюшных. Расположение мышечных клеток в каждом сегменте идентично (рис. 4). Каждый полусегмент состоит из 30 мышечных волокон, имеющих различные размеры, местоположение и ориентацию, каждое из которых иннервируется одним или несколькими из 38 уникальных моторных нейронов (Kim et al., 2009). При этом мышечные волокна 6, 7 и 4 проще всего идентифицировать (рис. 5) (Hoang, Chiba, 2001). Средняя длина волокон составляет около 400 мкм, ширина – 80 мкм, а толщина – 25 мкм.

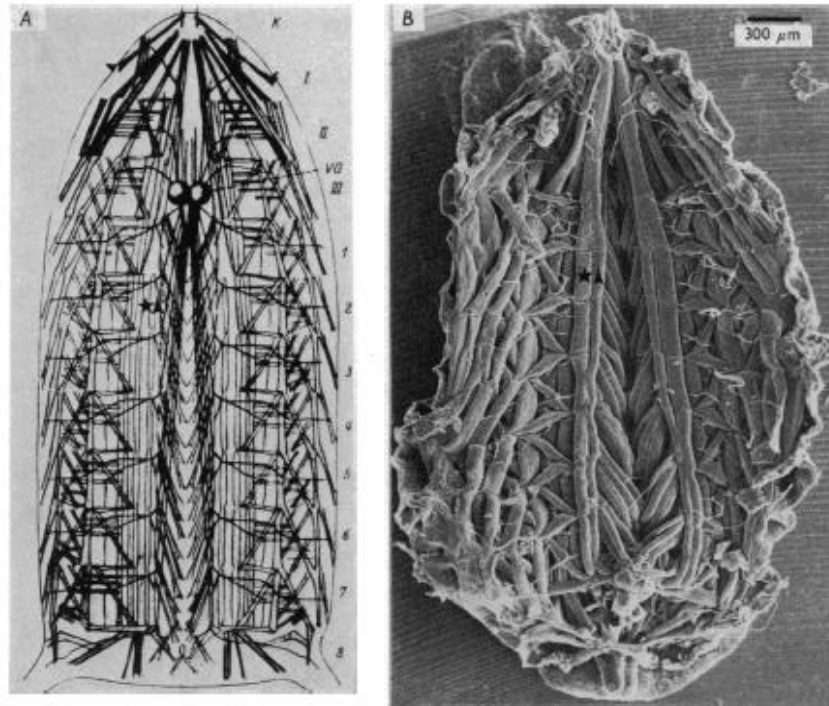


Рис. 4. А. Схема распределения нервов и мышц в личинке дрозофилы. В. Распределение мышечных волокон личинки третьего возраста, фотография сделана при помощи сканирующего электронного микроскопа. Звездочкой и треугольником на рис. А и В показаны 6 и 7 мышечные волокна, расположенные во втором брюшном сегменте (Jan, Jan, 1976b).

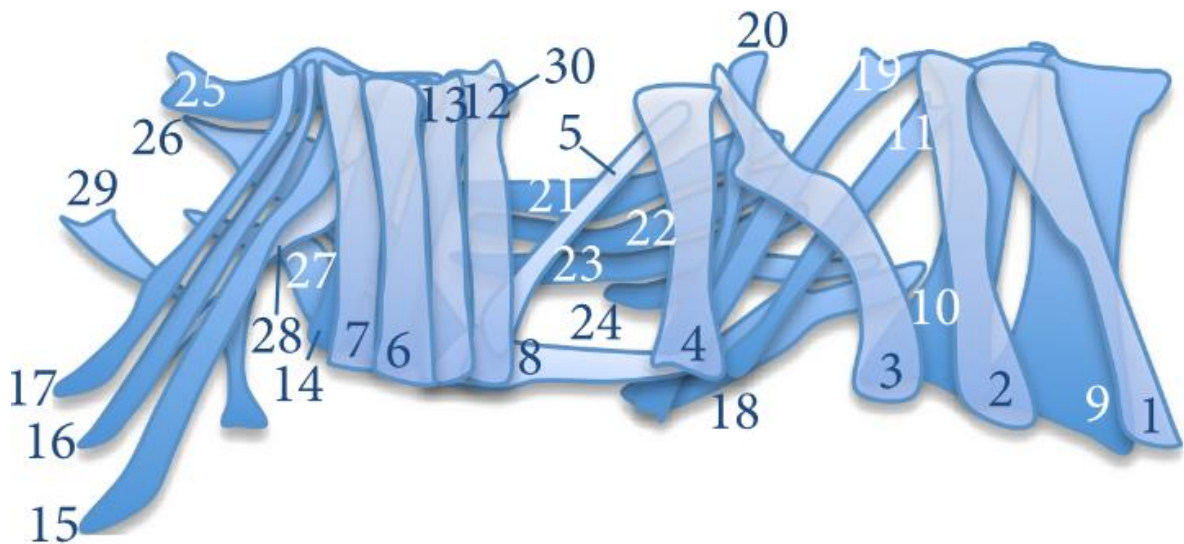


Рис. 5. Расположение мышечных волокон в одном полусегменте тела личинки *Drosophila* (West et al., 2015).

Нервно-мышечная система личинки имеет билатеральную симметрию и сегментарную организацию. Анатомически стереотипные нервные окончания осуществляют иннервацию каждого мышечного волокна личинки (Halpern et al, 1991).

Моторные аксоны выходят из вентрального нервного ствола в составе одной из 3 основных нервных ветвей: межсегментной (ISN), сегментарной (SN) или поперечной (TN) (Kim et al., 2009). В свою очередь сегментарная нервная ветвь подразделяется на SNa, SNb, SNc и SNd (рис. 6) (Hoang, Chiba, 2001).

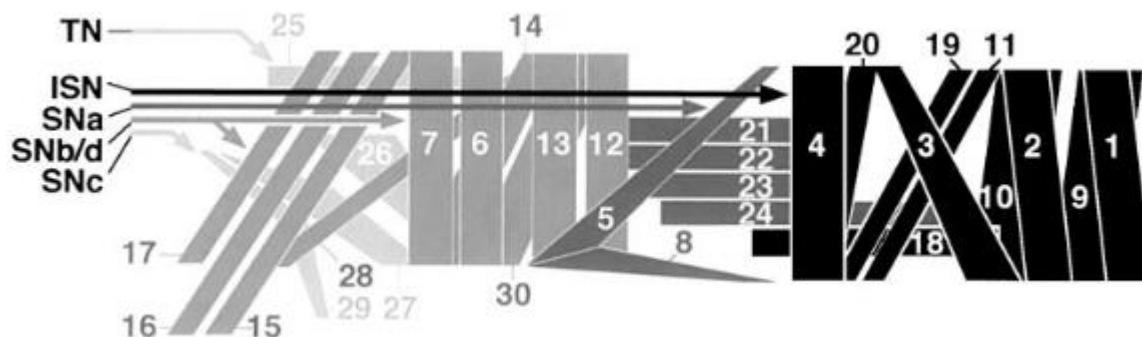


Рис. 6. Схема иннервации мышечных волокон поперечным нервом (TN), межсегментным нервом (ISN) и ветвями сегментарного нерва (SNa, SNb/d, SNc) (Hoang, Chiba, 2001).

Моторные нейроны локализованы в вентральных ганглиях. Окончание мотонейрона располагается на иннервируемой мышечной клетке. Ветви межсегментного нерва иннервируют двенадцать мышечных волокон, а четыре ветви сегментарного – все остальные. В месте контакта мышечного волокна и аксона мотонейрона происходит образование расширения, которое называется синаптическим бутоном. Иннервация каждой мышцы личинки дрозофилы осуществляется мотонейронами, образующими I, II и III типы синаптических окончаний (Hoang, Chiba, 2001). Иннервация 6 и 7 мышц личинки дрозофилы осуществляется аксонами мотонейронов MN6/7-Ib и MNSNb/d-Is в области между мышечными волокнами, содержащими бутоны Ib и Is типов соответственно (рис. 7). Мотонейрон MNSNb/d-Is иннервирует несколько мышечных волокон и формирует бутоны Is на всех мышцах, иннервируемых SNb/d, за исключением 17 и 28. (Hoang, Chiba, 2001).

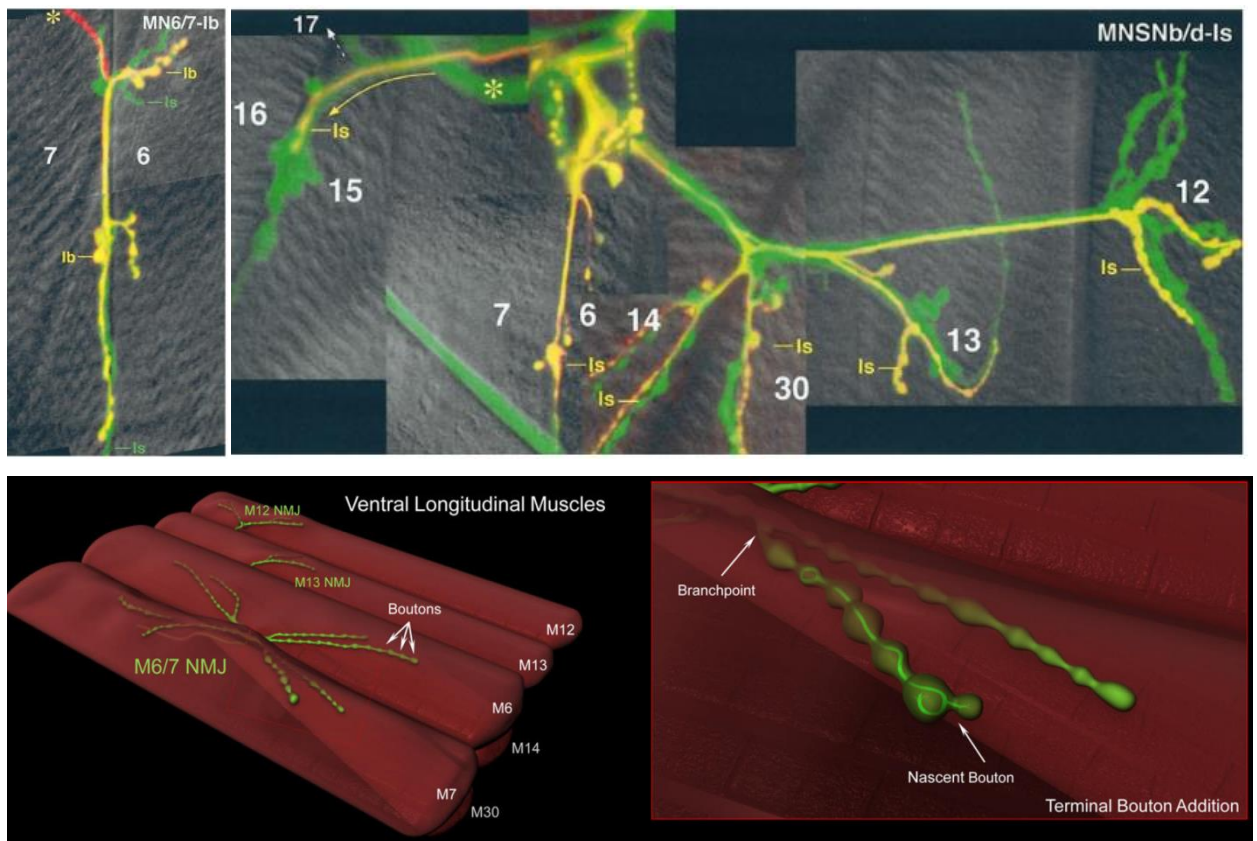


Рис. 7. Слева сверху представлен мотонейрон MN6/7-Ib, образующий бутоны Ib типа на 6 и 7 мышечных волокнах. Справа сверху показан мотонейрон MNSNb/d-Is, формирующий бутоны Is типа и иннервирующий сразу несколько мышц, в том числе 6 и 7 мышечные волокна. Масштаб: 20 мкм (Hoang, Chiba, 2001). Снизу слева приведена схема иннервации вентральных мышечных волокон 6, 7, 12 и 13. Снизу справа показана схема, иллюстрирующая зарождающийся (nascent) бутон в нервно-мышечном синапсе. Ярко-зеленым изображены пучки микротрубочек (Van Vactor, Sigrist, 2017).

Мышечная система эмбрионов и личинок дрозофилы отличается от таковой у взрослых мух, так как сначала в развитии мышцы состоят из отдельных клеток, а у взрослых дрозофил пучки волокон формируют мышцы (Hoang, Chiba, 2001; Dobi et al., 2015).

Миогенез у дрозофилы происходит в течение всего эмбриогенеза, причем 17 стадия эмбриогенеза является кульминационной, так как зрелые мышечные волокна начинают сокращаться (Schulman et al., 2015). В эмбриогенезе рост мотонейронов происходит прямо к соответствующим мышечным волокнам. 17 час эмбриогенеза ознаменует тем, что нервные окончания по анатомии уже напоминают окончания у личинок третьего возраста.

Личинки в своем развитии проходят три возрастные стадии, в течение которых площадь мышечных волокон возрастает примерно в 100 раз. Во время всего развития

личинки одновременно с увеличением мышечных волокон происходит увеличение нервно-мышечных синапсов (Long, Van Vactor, 2013; Schulman et al., 2015). Соответственно увеличивается объем бутонов, постсинаптический субсинаптический ретикулум и количество пресинаптических активных зон (Long, Van Vactor, 2013).

1.3.3. Строение нервно-мышечного синапса личинки дрозофилы

Синапс представляет собой структуру, которая позволяет нейрону передавать сигнал другому нейрону или клетке-мишени. Большинство синапсов – химические, в них электрический сигнал преобразуется в активной зоне в химический реагент (медиатор) (Zhai, Bellen, 2004).

Нервно-мышечный синапс личинки дрозофилы является хорошо изученным модельным объектом, зарекомендовавшим себя в области изучения развития синапсов и синаптической передачи. Кроме того, нервно-мышечный синапс личинки имеет значительное структурное и функциональное сходство с центральными синапсами позвоночных, поскольку и те, и другие являются глутаматергическими синапсами, а многие молекулы, участвующие в синаптической передаче, одинаковы. Однако в отличие от центральных синапсов позвоночных, пре- и постсинаптические компоненты нервно-мышечного синапса личинки хорошо идентифицируются, легкодоступны, а также неизменны от личинки к личинке (West et al., 2015).

У дрозофилы нервно-мышечный синапс образуют мотонейрон и мышечная клетка. В нервно-мышечном синапсе выделяют пресинаптическую и постсинаптическую мембраны, которые разделяет синаптическая щель шириной примерно 15-20 нм (Jia et al., 1993).

На концах аксонов образуются расширения, называемые синаптическими бутонами, которые содержат заполненные нейромедиатором везикулы. Главный медиатор в нервно-мышечном синапсе *Drosophila* - аминокислота L-глутамат, при попадании которой в синаптическую щель происходит активация постсинаптических рецепторов и деполяризация в мышечных волокнах (Jan, Jan, 1976a; Atwood et al., 1993; Bucher, 2008).

В зависимости от нервного волокна возможны различия в форме, размере, местоположении бутонов и в типе нейромедиатора (Atwood et al., 1993; Jia et al., 1993; Hoang, Chiba, 2001). В зависимости от медиатора бутоны подразделяются на три типа (таблица 1).

Таблица 1. Классификация бутонов по типу медиатора:

ТИП		МЕДИАТОР
Тип I	Ib	L-глутамат
	Is	
Тип II		Октопамин/ L-глутамат
Тип III		Инсулиноподобные пептиды

К I типу относятся преимущественно крупные синаптические бутоны, содержащие везикулы с глутаматом, а терминали аксонов, формирующие небольшие бутоны с везикулами с октопамином и глутаматом, относятся ко II типу. В свою очередь бутоны I типа делят на два типа: Ib (I big) и типа Is (I small). Медиатор L-глутамат является первичным возбуждающим медиатором в большинстве мышечных клеток насекомых (Jan, Jan, 1976a). III тип бутонов, несущий везикулы с инсулиноподобными пептидами, обнаружен только у двенадцатого мышечного волокна (рис. 8) (Hoang, Chiba, 2001).

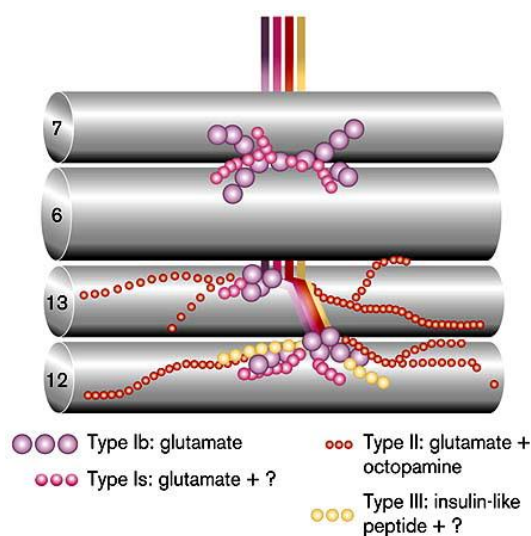


Рис. 8. Схематическое изображение иннервации мышечных волокон 6/7 и 12/13 различными типами синаптических бутонов (Guan et al., 1996).

Бутоны типа Ib большие, их размер по разным данным колеблется от 2 до 6 мкм, а площадь в среднем равна 5 мкм² (Atwood et al., 1993; Hoang, Chiba, 2001; Kern et al., 2013). Аксоны, которые несут этот тип бутонов, обычно короткие и мало ветвятся. Для всех мышечных волокон личинки показана иннервация бутонами Ib типа (Hoang, Chiba, 2001). Вокруг бутонов этого типа располагается хорошо выраженный субсинаптический ретикулум, формируемый мембраной мышечной клетки. Его точная роль еще не

выявлена, однако существует предположение, что он может контактировать с сигнальными молекулами, участвовать в синтезе субсинаптических белков и необходим для корректной сборки постсинаптического аппарата (Atwood et al., 1993; Jia et al., 1993; Long, Van Vactor, 2013).

Бутоны типа Is несколько меньше по размерам, их размер по разным данным колеблется от 1-1,5 мкм до 2-4 мкм (Саранцева и др., 2012; Hoang, Chiba, 2001). Аксоны, несущие их, обычно более длинные и разветвленные по сравнению с бутонами Ib типа, а размер субсинаптического ретикулума наоборот меньше (Hoang, Chiba, 2001).

Отличия в бутонах Is и Ib обнаружены не только в размере, но и в свойствах. Так, при стимуляции аксонов с бутонами типа Is генерируются относительно высокоамплитудные постсинаптические ответы, тогда как у бутонов типа Ib регистрируется меньшая амплитуда ответов (Karunanithi et al., 2002; Ball et al., 2003).

Бутоны II типа меньше по размеру (1-2 мкм), а несущие их аксоны значительно длиннее. Бутоны этого типа овальной формы и иннервируют большинство мышечных волокон. III тип бутонов, иннервирующий только 12 мышечное волокно, имеет средние размеры (2-3 мкм), а аксоны, несущие их, средней длины. По внешнему виду аксоны с бутонами III типа напоминают аксоны с бутонами Is и II типа (Hoang, Chiba, 2001). Вокруг бутонов II и III типов нет субсинаптического ретикулума (Jia et al., 1993).

Кроме того, выделяют сателлитные бутоны, которые могут отпочковываться от уже сформированных бутонов и от межбуточной аксонной связки между двумя бутонами (Саранцева и др., 2012). Существует предположение, что сателлитные бутоны являются бутонами, не успевшими полностью отделиться от основного бутона. Образование новых бутонов может способствовать разрастанию нервного окончания.

Бутоны содержат четкие и округлые синаптические везикулы с диаметром около 30-40 нм, занимающие большую часть бутона и распределенные по его площади. При этом в бутонах Is типа содержатся маленькие и плотные везикулы, а в бутонах Ib типа – большие везикулы.

Расположение синаптических везикул в бутонах неоднородно (Зефилов, Петров, 2010). Были выделены три основных пула везикул в зависимости от расположения: резервный и циркулирующий пулы, а также готовые к высвобождению нейромедиатора везикулы. Формирование везикул происходит либо в аппарате Гольджи, после чего с помощью прямого аксонного транспорта они поставляются в синапс, либо путем эндоцитоза в процессе восстановления везикул из пресинаптической мембраны.

Самый большой пул везикул – это резервные везикулы, расположенные ближе к центру бутона. Они принимают участие в экзоцитозе только в случае сильных нефизиологических воздействий (Зефилов, Петров, 2010; Denker et al., 2009). Циркулирующий пул везикул расположен по периферии бутонов, этот пул не восполняется за счет резервного пула. Особенностью дрозофилы по сравнению с млекопитающими является то, что в центральной области бутона везикулы практически отсутствуют, таким образом происходит смешивание везикул резервного и циркулирующего пулов на периферии (Denker et al., 2009).

Готовыми к выбросу везикулами называют везикулы, расположенные рядом с активными зонами. Эти везикулы первыми высвобождают нейромедиатор при стимуляции. Перед выделением медиатора происходит образование белкового комплекса, в отсутствие которого процесс экзоцитоза не возможен. Этот комплекс образуют белки, которые делятся на три группы: везикулярные, цитоплазматические и белки пресинаптической мембраны (Зефилов, Петров, 2010).

1.3.4. Строение активных зон

Термин "активная зона" был придуман в 1970 году. Ультраструктурные исследования синапсов в различных организмах выявили, что активные зоны сохраняют морфологические особенности независимо от их размера, местоположения, типов нейронов и их целей. Во-первых, плазматическая мембрана активной зоны представляет собой электронно-плотное тело, предполагая белковую природу. Во-вторых, кластеры синаптических пузырьков связываются в активной зоне, а также имеется механизм предохранения несвоевременного высвобождения медиатора из везикулы. В-третьих, активная зона точно выровнена по площади с постсинаптической плотностью (PSD), таким образом, что активная зона охватывает такую же ширину, что и PSD во внеклеточном пространстве (Zhai, Bellen, 2004).

Активная зона (АЗ) – это специализированная область пресинаптической мембраны, в которой происходит регулируемое высвобождение медиатора из синаптических везикул. В каждом пресинаптическом бутоне содержатся электронно-плотные участки, называемые активными зонами, где происходит докирование и слияние синаптических везикул (Zhai, Bellen, 2004; Schmid, 2006; Ackermann et al., 2015). Важно отметить, что активная зона – это высоко динамичная структура, поддерживающая пресинаптическую реконструкцию, изменения в реализации нейротрансмиссии и, таким образом, участвующая в синаптической пластичности (Ackermann et al., 2015).

Активные зоны можно разделить на морфологически различные группы: те, что имеют сложные электронно-плотные проекции, такие как Т-структуры и ленты (ribbon) и те, что имеют менее известные плотные проекции, включая активные зоны *C. elegans* и те, что присутствуют у большинства позвоночных в синапсах центральной нервной системы (Ackermann et al., 2015).

В активных зонах дрозофилы были обнаружены плотные тельца (Т-структуры), что отражает их морфологию (рис. 9). Они представляют собой нити, которые выходят из одного основания. Т-структуры образуют «платформу» для везикул и играют важную роль в синаптической передаче, в том числе в кластеризации кальциевых каналов и высвобождении везикул. Архитектура активной зоны облегчает связывание, докирование и слияние синаптических везикул с плазматической мембраной (Zhai, Bellen, 2004). Локализация кальциевых каналов вблизи активной зоны способствует осуществлению нейротрансмиссии без задержек (Ackermann et al., 2015). Расстояние между Ca^{2+} каналом и местом докирования везикулы с активной зоной менее 50 нм (Zhai, Bellen, 2004).

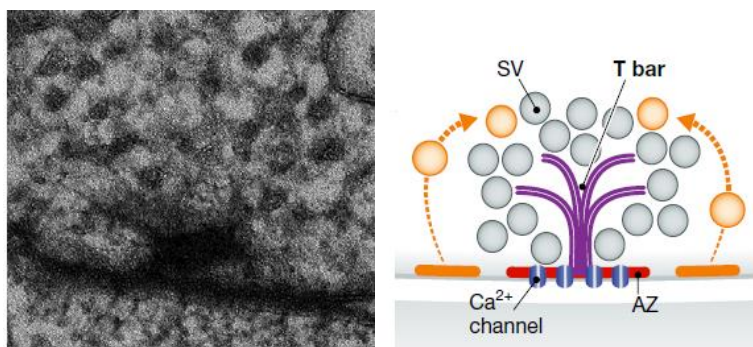


Рис. 9. Активные зоны в нервно-мышечном синапсе дрозофилы. Активная зона образована платформой, из которой выходят сетчатые нити. Такое строение активной зоны получило название Т-структура. AZ – активная зона. SV – синаптическая везикула (Ackermann et al., 2015).

Организация активных зон, в том числе расстояние между ними, плотность и расположение относительно постсинаптических рецепторных полей, жестко регулируются для обеспечения эффективной синаптической передачи. Плотность активных зон в нервно-мышечных синапсах остается постоянной в течение развития, что указывает на жесткий контроль над сборкой активных зон (Blunk et al., 2014).

В активной зоне выделяют три морфологически и функционально различных компонента:

1) плазматическая мембрана, прилегающая к постсинаптической плотности (PSD), где происходит слияние синаптических везикул;

2) цитоматрикс, который примыкает ко внутренней стороне плазматической мембраны и является местом докиривания синаптических везикул;

3) электронно-плотные проекции, идущие от цитоматрикса к цитоплазме, с которыми связываются синаптические везикулы.

Все активные зоны имеют эти три компонента, хотя они различаются по внешнему виду, особенно по размеру и форме плотных проекций (Zhai, Bellen, 2004).

Нервно-мышечный синапс дрозофилы, иннервирующий 6/7 мышечные волокна, включает в себя целых 500 независимых активных зон, каждая из которых непосредственно соединена с кластером глутаматных рецепторов (Viquez et al., 2009; Stevens et al., 2012). Нервное окончание, иннервирующее 4 мышечное волокно, меньше, чем то, которое иннервирует 6/7 мышцы, и количество активных зон соответственно ниже (Cheng et al., 2011).

В зависимости от размера бутона может варьировать количество активных зон (рис. 10). В среднем в бутоне Ib типа может быть от 10 до 20 активных зон (Blunk et al., 2014). По другим данным количество активных зон на бутон в нервном окончании, иннервирующем 4 мышечное волокно, составляет 13,5, а в нервном окончании, иннервирующем 6/7 мышечные волокна – 12,4. Однако в этой статье авторы не разделяли бутоны по типам (Ib/Is) (рис. 11) (Sutcliffe et al., 2013). В еще одном исследовании выявлено, что в бутоне типа Ib у дрозофилы дикого типа около 9 активных зон (для нервных окончаний, иннервирующих 6/7 мышечные волокна) (Astorga et al., 2016). В бутонах типа Is количество активных зон меньше, около 4-5 на бутон (Paul et al., 2015).

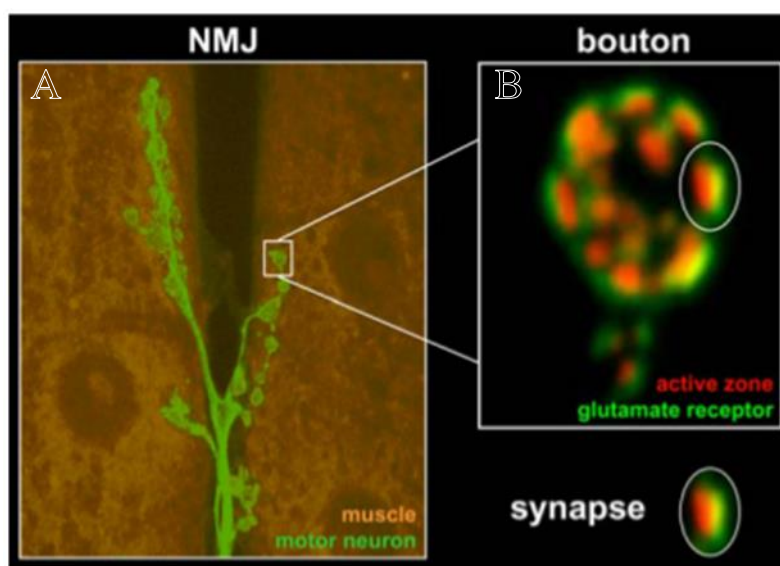


Рис. 10. А. Нервное окончание (зеленое), иннервирующее 6 и 7 мышечные волокна (оранжевые). Мотонейрон образует расширения, называемые синаптическими бутонами.

В. Изображен бутон Ib типа, имеющий около 15 синапсов. В каждом синапсе расположена активная зона на пресинапсе (красные точки) и рецепторы к L-глутамату на постсинапсе (зеленые точки) (Schmid, 2006).

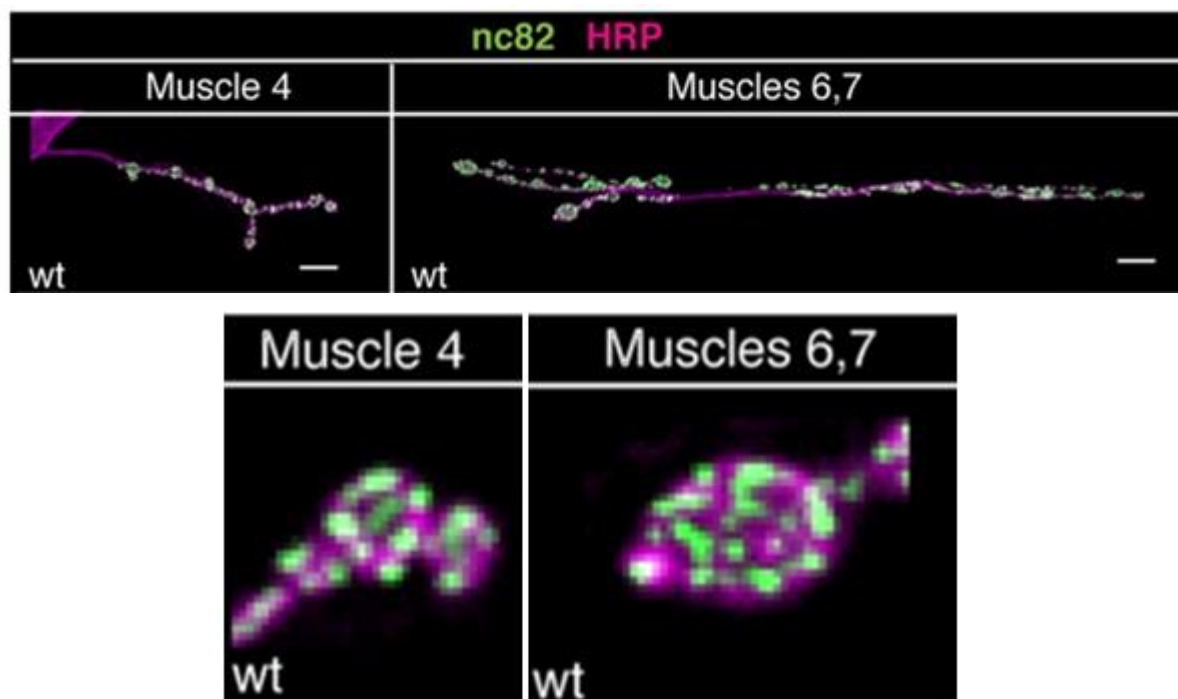


Рис. 11. Нервные окончания личинки дрозофилы третьего возраста, иннервирующие 4 мышечное волокно (слева сверху) и 6/7 мышечные волокна (сверху справа). Зеленый цвет - белок Bruchpilot активных зон, меченный nc82. Пурпурный цвет - нервные окончания, визуализированные с использованием HRP. Снизу представлены увеличенные изображения бутонов на 4 и 6/7 мышечных волокнах. Масштаб 20 мкм (Sutcliffe et al., 2013).

В активной зоне дрозофилы располагаются следующие белки: Bruchpilot (Brp), dRBP, Dunc13, RIM, Fife, Neurexin, Neuroligin и Intersectin. Bruchpilot, dRBP и Fife относятся к синаптическим скаффолд-белкам. Было обнаружено, что белок Bruchpilot – ключевой компонент Т-структур. Отдельные молекулы Brp принимают удлиненную конформацию, тянущуюся от мембраны активной зоны к цитоплазме бутонов, тем самым формируя Т-плотные структуры (Wagh et al., 2006; Ackermann et al., 2015). Brp имеет важное значение для кластеризации Ca^{2+} каналов под Т-структурой в центре активной зоны, благодаря этому источник Ca^{2+} близок к месту высвобождения синаптической везикулы из активной зоны. Эта тесная ассоциация создается двумя изоформами Brp, которые собираются в шахматном порядке, образуя круговой массив вокруг Т-структуры (Ackermann et al., 2015). Белок dRBP тоже участвует в кластеризации кальциевых каналов.

RIM (Rab3-interacting molecule) играет важную роль в синаптической передаче. RIM взаимодействует с Dunc13 (у дрозофилы это гомолог Unc13), способствуя праймингу и стыковке (докированию) синаптических везикул. В организации активной зоны принимает участие белок Fife. Neurexin и Neuroligin являются синаптическими белками адгезии и участвуют в сборке синапса, а Neurexin задействован еще и в росте синапса. Функция эндоцитотического белка Intersectin заключается в участии в слиянии синаптических везикул и в восстановлении мембраны. Взаимодействие потенциал-зависимых кальциевых каналов с активными зонами опосредовано RIM-связывающими белками (RBP), у млекопитающих таких белков три, а у дрозофилы один (Ackermann et al., 2015).

Белки ELKS/CAST/ERC позвоночных были идентифицированы как компоненты АЗ (Südhof, 2012). Белки ELKS/CAST/ERC формируют большие олигомерные белковые комплексы с другими известными белками CAZ (Munc-13, RIM1, Piccolo, Bassoon) и считается, что они вовлечены в молекулярную организацию пресинаптической активной зоны, где они регулируют высвобождение нейротрансмиттера (Wagh et al., 2006). Белок дрозофилы Brp имеет N-концевой домен со значительной гомологией последовательности с ELKS/CAST/ERC позвоночных и большой С-концевой домен, богатый суперспирализованными структурами, подобными нескольким цитоскелетным белкам (рис. 12). Для С-конца Brp наблюдается сходство последовательностей с такими цитоскелетными белками, как плектин, рестин и тяжелая цепь миозина, что указывает на возможную цитоскелетную роль. Было выдвинуто предположение, что Brp может сочетать функции ELKS/CAST/ERC и структурного белка цитоскелета в одном полипептиде, который является высококонсервативным среди насекомых (Wagh et al., 2006).

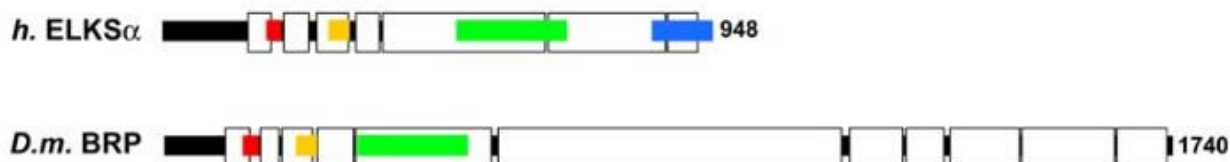


Рис. 12. Сравнение суперспирализованных доменов (белые блоки) и консервативных областей (цветные участки) для гомологов белков семейства ELKS/CAST/ERC человека (ELKS α) и дрозофилы (Brp) (Wagh et al., 2006).

Делеция Brp вызывает потерю Т-структур, характерных для синапсов дрозофилы. Однако делеция Brp уменьшала выделение нейротрансмиттера только на 30%.

Поразительно, что удаление 17 С-концевых остатков Vpr, которые являются частью плектин-гомологичной области, нарушает прикрепление синаптических везикул к Т-структурам в синапсах дрозофилы и изменяет синаптическую передачу, что позволяет предположить, что основной вклад в функцию Vpr вносит плектин-гомологичный регион (Südhof, 2012).

Важной функцией белка Vpr в нервно-мышечном синапсе *Drosophila* является его участие в высвобождении L-глутамата и в кластеризации кальциевых каналов (Paul et al., 2015). У дрозофилы Vpr играет роль основной структурной и функциональной составляющей цитоматрикса активной зоны. Кроме того, Vpr поддерживает эффективность высвобождения нейромедиатора, участвует в формировании синаптической пластичности и в определенных формах обучения (Ehmann et al., 2014).

С помощью электронной микроскопии установлено, что молекулы Vpr сгруппированы в 10-нм нити, и в среднем цитоматрикс одной активной зоны содержит около 137 молекул Vpr. При этом три четверти молекул Vpr собираются в 15 поляризованных палочковидных гептамеров из суперспирализованных α -спиралей с образованием мультибелковых филаментов. 7 субфибрилл образуют промежуточные нити с диаметром 10 нм (Ehmann et al., 2014).

Почти все белки цитоматрикса активной зоны, обнаруженные в синапсах беспозвоночных, также присутствуют в синапсах млекопитающих, что предполагает значительное сохранение функции в ходе эволюции. Имеются всего два исключения – белки Piccolo и Bassoon, которые, возможно, появились для выполнения конкретных функций у позвоночных. Тем не менее, было проведено исследование, показывающее, что у дрозофилы имеется белок Fife, который избирательно локализуется в активной зоне дрозофилы, возможно являющийся гомологом Piccolo (Ackermann et al., 2015).

В одном исследовании было показано, что количество Т-структур пропорционально размеру нервно-мышечного синапса дрозофилы (Clarke et al., 2012). По имеющимся данным у дрозофилы дикого типа 25% синаптических контактов содержат 0 Т-структур, 63% – 1 Т-структуру, 10% содержат 2 Т-структуры и 2% содержат 3 Т-структуры (Coyle et al., 2004).

Активные зоны внутри бутона располагаются напротив рецепторов глутамата (рис. 13) (Harris, Littleton, 2015).

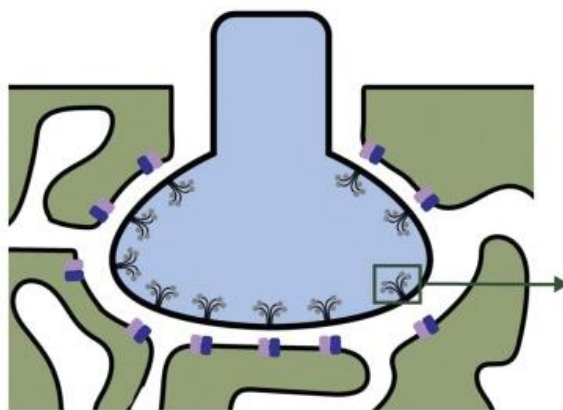


Рис. 13. (А) Одиночный бутон в нервно-мышечном синапсе (синий), располагающийся в складках субсинаптического ретикулума мышц (оливково-зеленый). Активные зоны расположены напротив глутаматных рецепторов (Harris, Littleton, 2015).

В активных зонах и мембране синаптических везикул обнаружили APP, который, предположительно, связывается с белками SNARE-комплекса. Методом масс-спектрометрии показано, что APP локализуется в синаптической везикуле в тесном контакте с кальциевым сенсором – синаптотагмином-1 (syt-1). Колокализация была зарегистрирована в эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и везикулярных структурах. Приток кальция вызывает быстрый экзоцитоз нейромедиаторов путем связывания с синаптотагмином-1. В процессе экзоцитоза, APP оказывается во внеклеточном пространстве и может быть расщеплен α -секретазой. Рециклинг компонентов синаптической везикулы происходит через эндосомы - место, где APP расщепляется β - и γ -секретазами с генерацией пептидов $A\beta$. С помощью метода FRET продемонстрирована тесная молекулярная близость синаптотагмина-1 и APP, таким образом эти 2 белка непосредственно взаимодействуют друг с другом. Взаимодействие syt-1 и APP может играть роль в регуляции процессов роста. Кроме того, возможно, что APP влияет на функционирование кальциевого сенсора, повышая его чувствительность к кальцию и способствуя экзоцитозу везикул (Kohli et al., 2012). В одной из работ было показано, что на уровень мРНК syt-1 влияет гиперэкспрессия APP, причем снижение уровня мРНК вызвано экспрессией APP независимо от секреции $A\beta$ (Rodin et al., 2015).

Активные зоны обеспечивают пространственный и временной контроль слияния везикул. Большие многодоменные белки, богатые биспиральными последовательностями, такие как Bassoon, Piccolo и Vpr, являются основными структурными и функциональными организаторами активных зон. И избыток этих белков положительно коррелирует с высвобождением нейромедиатора. Белок Vpr у дрозофилы имеет решающее значение для

синхронного высвобождения глутамата и кластеризации кальциевых каналов в активной зоне. Как предполагается, Vpr – это ключевой белок, который определяет вероятность высвобождения медиатора из везикул. В это же время *syt-1* имеет решающее значение для инициирования процесса экзоцитоза и может действовать как в качестве датчика кальция, так и перетяжки при слиянии везикул. Изменение роли синаптотагмина-1 от перетяжки к датчику может происходить в ответ на приток кальция в пресинаптические окончания. В одном из исследований было показано функциональное взаимодействие Vpr и *syt-1*. Кроме того, эти данные свидетельствуют о центральной роли этих двух белков в пространственной дифференциации активных зон, в том числе показано, что количество активных зон в бутоне, а также количество и распределение молекул Vpr на активную зону является синаптотагмин-1-зависимым. Взаимодействие Vpr и *syt-1* влияет на количество активных зон в каждом бутоне, но не на площадь бутонов, что может говорить о том, что влияние *syt-1* на размер бутона и дифференциацию активных зон не строго связаны между собой. В это же время структурно-функциональная пресинаптическая дифференциация, очевидно, требует согласованных действий этих белков. Синаптотагмин-1 способствует докированию везикулы в активной зоне, расположению ее внутри активной зоны, фиксации и запуску высвобождения из активной зоны. Однако остается неясным, какие именно молекулярные домены *syt-1* отвечают за взаимодействие с Vpr (Paul et al., 2015).

1.3.5. Механизм экзоцитоза синаптических везикул

Белковый комплекс, осуществляющий процесс экзоцитоза, образуется везикулярными, цитоплазматическими белками, а также белками пресинаптической мембраны.

Везикулярные белки обязаны своим названием расположению в мембране везикул. К ним относятся синаптотагмин, синаптобrevин и Rab3. Синаптотагмин является сенсором кальция, имеющим четыре сайта для его связывания. Поскольку экзоцитоз – кальций-зависимый процесс, он может произойти только после того, как синаптотагмин свяжется с четырьмя ионами Ca^{2+} . Другой везикулярный белок, синаптобrevин, может связываться с цитоплазматическими и пресинаптическими белками и формировать SNARE-комплекс, который за счет заякоривания синаптической везикулы на пресинапсе способствует высвобождению нейромедиатора. Третий везикулярный белок, Rab3, препятствует преждевременному экзоцитозу медиатора.

К пресинаптическим белкам относят синтаксин и SNAP-25. Они могут связываться с синаптобrevином и участвовать в образовании SNARE-комплекса.

Цитоплазматический белок Unc18 у дрозофилы (гомолог Munc18 млекопитающих) необходим для ускорения образования SNARE-комплекса и прикрепления синаптической везикулы к мембране.

В процессе экзоцитоза выделяют три стадии: сцепление, докирование и прайминг.

В первую очередь осуществляется транспорт везикул к активной зоне, где расположена Т-структура, образующая платформу для заякоривания везикулы и реализующая процесс синаптической передачи (Prokop, Meinertzhagen, 2006).

В первой стадии экзоцитоза принимают участие белки Rab3 и синтаксин, во второй стадии (докировании) к этим белкам добавляются синаптобrevин, SNAP-25 и Unc18. Последняя стадия (прайминг) ознаменуется полностью сформированным SNARE-комплексом. На этой стадии полностью готовая к высвобождению везикула ожидает входа Ca^{2+} и его связывания с синаптотагмином. После поступления Ca^{2+} в пресинапс, содержимое везикулы выделяется в синаптическую щель, таким образом происходит процесс экзоцитоза.

Экзоцитоз может осуществляться несколькими путями, в том числе слиянием мембраны везикулы с мембраной пресинапса и kiss-and-run (т.е. поцеловал и убежал) (Зефилов, Петров, 2010). Во втором случае не происходит полное слияние мембран везикулы и пресинапса, а образуется лишь временная пора, через которую в синаптическую щель выделяется медиатор из везикулы. После завершения выделения нейромедиатора такая пора закрывается, белковый комплекс разрушится, и везикула уйдет с пресинаптической мембраны.

После экзоцитоза глутамата из пресинаптической мембраны происходит его связывание глутаматными рецепторами на постсинапсе. Эти рецепторы формируют кластеры прямо напротив пресинаптических активных зон. У дрозофилы обнаружены специфические ионотропные рецепторы глутамата А и В типов, различающиеся по строению и физиологическим функциям. Эти рецепторы по строению отчасти схожи с AMPA рецепторами человека. Поскольку рецепторы глутамата у дрозофилы являются ионотропными, то они могут функционировать и как рецептор, и как канал. Постсинаптический ответ формируется при открытии ионного канала после взаимодействия рецептора с медиатором L-глутаматом (Völkner et al., 2000; Long, Van Vactor, 2013).

1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент весьма актуально исследование физиологических и патофизиологических эффектов APP и A β , поскольку продемонстрирована их важная роль в функционировании клеток (Мухамедьяров, Зефилов, 2013; Zheng, Koo, 2006). Изучение роли этих белков может пролить свет на причины и механизмы возникновения ряда заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера. У млекопитающих изменение экспрессии белка предшественника амилоида может вызывать дисфункцию синапсов и различные морфологические нарушения, а его протеолитический фрагмент A β может оказывать влияние на синаптическую передачу и пластичность (Ting et al., 2007; Tyan et al., 2012; Carrillo-Mora et al., 2014). Однако млекопитающие являются не самой удачной моделью для данных исследований, поскольку не представляется возможным разделить эффекты APP и A β . Именно поэтому более удобной моделью считается личинка *Drosophila melanogaster*, так как существует возможность исследовать влияние этих белков независимо друг от друга.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика экспериментального объекта

Опыты проводились с использованием трансгенных линий *Drosophila melanogaster*. Для экспрессии необходимых генов в моторных нейронах личинки использовали дрожжевую бинарную систему GAL4/UAS. Первая линия, используемая в качестве контроля, отличалась от дикого типа наличием конструкции *Gal4-D42* (линия Контроль), запускающей транскрипцию в мотонейронах. Во второй линии *UAS-APP*; *UAS-BACE*; *Gal4-D42* (линия APP+BACE), содержащей гены *APP* и β -секретазы человека, происходило образование APP, а также β -амилоида за счет экспрессии β -секретазы. Третья линия *UAS-A β 42*; *Gal4-D42* (линия A β) содержала последовательность белка A β , образующегося без участия APP и β -секретазы, то есть в данной линии происходила прямая экспрессия этого белка. В данной линии происходила экспрессия A β 42, который содержал в своей последовательности 42 аминокислоты.

Дрожжевая бинарная система GAL4/UAS представляет собой стандартную конструкцию при экспрессии генов у *Drosophila melanogaster*. С использованием системы GAL4-UAS можно направить ген интереса в различные ткани или типы клеток. Это система, состоящая из двух частей: гена *GAL4*, который кодирует дрожжевой транскрипционный активатор GAL4 и энхансера UAS, активируемого GAL4, что приводит к запуску транскрипции генов. Как правило, UAS с геном интереса экспрессируются в двух различных линиях с активатором транскрипции GAL4. Таким образом, система GAL4/UAS используется для направленной экспрессии гена, позволяющей избирательно активировать любой клонированный ген (Hui Ping Tan, Azzam, 2017; Hirth, 2010; Жимулев, 2000; Brand, Perrimon, 1993).

Одной из важных особенностей этой системы является встраивание активатора транскрипции GAL4 и гена интереса (UAS-transgene) в геномы разных особей, поэтому экспрессия интересующего гена возможна только у их потомства. Необходимую трансгенную линию *Drosophila melanogaster* получали с использованием двух родительских линий. В первую родительскую линию был введен транскрипционный активатор GAL4, а во вторую был встроен энхансер UAS с геном интереса. Экспрессия гена интереса невозможна без активатора. У потомства, появляющегося при скрещивании этих родительских особей, в геном встроены и активатор, и ген интереса, соответственно, у них происходит синтез интересующего нас белка (рис. 14) (Brand, Perrimon, 1993).

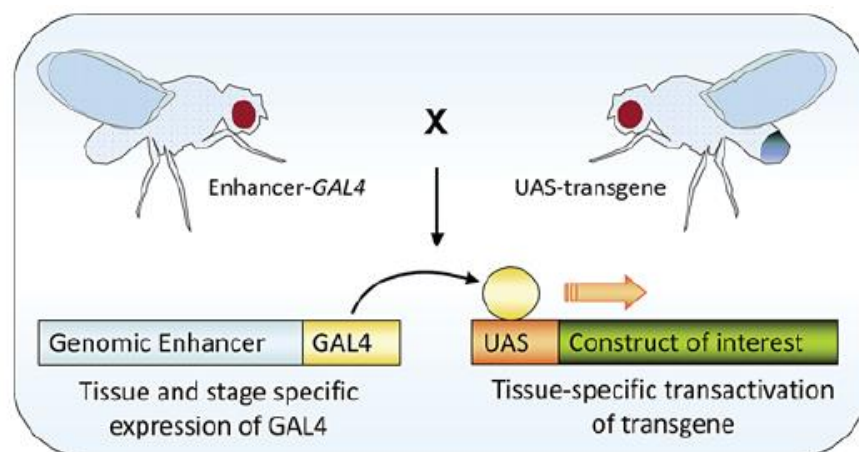


Рис. 14. Направленная экспрессия генов с использованием конструкции GAL4/UAS у *Drosophila melanogaster* (Bennett et al., 2015).

Мушки содержались в пробирках с использованием стандартной питательной среды при комнатной температуре ($t = 25^0$ C) и двенадцатичасовом световом дне. Питательная среда состояла из агара, сухих дрожжей, сахарного песка и манки. Линии мух были любезно предоставлены д.б.н. Светланой Владимировной Саранцевой (зав. лабораторией экспериментальной и прикладной генетики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова). Опыты проводили на личинках дрозофилы, полученных при скрещивании трансгенных линий. Во избежание скрещивания родительских особей с потомством, что необходимо для сохранения интересующих нас генов, исходных трансгенных мух пересаживали на новую питательную среду.

Исследования проводились на личинках третьего возраста на 2, 3, 4 и 5 сегментах на нервных окончаниях, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна. Выбор данных нервных окончаний обусловлен тем, что 6 и 7 мышечные волокна наиболее крупные, что облегчает их идентификацию. Важно отметить, что основное количество проведенных на данный момент исследований нервно-мышечного синапса дрозофилы выполнено на нервных окончаниях, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна. Эти волокна хорошо изучены, имеются данные по их морфологии и электрофизиологические исследования. Показано, что иннервация 6 и 7 мышечных волокон осуществляется двумя мотонейронами, образующими бутоны Ib и Is типа (Ball et al., 2003; Zhang, Stewart, 2010).

2.2. Приготовление нервно-мышечного препарата личинки *Drosophila melanogaster*, характеристика экспериментальных условий и растворы

При приготовлении препаратов использовались личинки *Drosophila melanogaster* третьего возраста, фосфатно-солевой буфер (PBS), который содержал 0,137 моль/л NaCl и

0,0027 моль/л KCl. Приготовление 0,01М раствора буфера с pH 7,3-7,5 осуществлялось из расчета 1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды.

Препарирование личинок дрозофилы осуществлялось с использованием энтомологических игл (длина 12 мм, диаметр 0,1 мм), пластиковых чашек Петри (диаметр 35 мм) с силиконовым полимерным основанием для фиксации животного (Sylgard), бинокулярного микроскопа МБС-1, набора инструментов для препаровки, пипетки, для подсветки препарата использовали оптоволоконный двойной осветитель SJ8038HA2.

Личинку перемещали в чашку Петри и располагали дорзальной стороной к покрытию чашки. После придания правильного положения, фиксация личинки осуществлялась с головного и каудального концов с использованием энтомологических игл к силиконовому покрытию чашки, при этом несильно растягивали тело личинки в длину. Дальнейшую препаровку после фиксации в чашке Петри проводили в растворе PBS, постоянно следя за тем, чтобы препарат всё время находился в растворе.

Первый поперечный надрез делали на головном конце, второй – на каудальном конце, после этого один продольный надрез вдоль тела личинки. Энтомологическими иглами оттягивали края кутикулы, которые образовались после разрезов, таким образом раскрывая полость тела личинки. Далее, следя за сохранностью нервных ганглиев, производили очистку рабочей поверхности от внутренних органов. Края кутикулы оттягивали так, чтобы были видны интересующие нас мышечные волокна.

2.3. Антитела и иммуногистохимия

Белок Bruchpilot (Bpr) дрозофилы – это ключевой белок Т-структур активных зон. Визуализация активных зон осуществлялась с использованием первичных моноклональных антител nc-82 (1:200), связывающихся с Bpr. Визуализация нервных окончаний проводилась с использованием антител к пероксидазе хрена (HRP) (1:400).

Иммуногистохимическое исследование включало в себя следующие этапы:

1. Фиксация препарата в 3,9% растворе параформальдегида;
2. Промывание в PBS;
3. Замачивание в блокирующем буфере (не меньше 1 часа);
4. Инкубация с первичными антителами nc-82 (1:200) на 12 часов при 4⁰ С;
5. Отмывание с помощью PBS первичных антител;
6. Инкубация с вторичными антителами Cy-3 (1:200) вместе с антителами к пероксидазе хрена (1:400) (2 часа при комнатной температуре);
7. Отмывание с помощью PBS вторичных антител;

8. Заключение в среду для заключения Vectashield, которая препятствует выгоранию флуоресцентного сигнала.

Во избежание повреждения флуоресцентных меток, препарат не подвергали прямому воздействию света.

Для получения изображений использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Leica DMI6000 с масляным объективом 40 с цифровой апертурой 1,3. Съемка препарата проводилась в двух каналах: зеленом (длина волны 488 нм) и красном (длина волны 543 нм). Съемка проводилась с разрешением 2048x2048 пикселей в формат LIF. Для более точного последующего анализа активных зон в синаптических бутонах проводили съемку нервного окончания, разбив его на 2-3 последовательных участка. Съемка осуществлялась послойно с шагом 0,5 мкм, что обеспечило получение более полных и четких изображений. Для последующего анализа нервного окончания производили наложение слоев друг на друга (рис. 15). Работа выполнена на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Изображения анализировали с помощью программ LAS X (Leica Application Suite X) и Fiji (Fiji Is Just ImageJ). Анализировали длину нервных окончаний, число ветвлений и бутонов различных типов (Ib, Is, сателлитных), количество активных зон на нервное окончание, количество активных зон в бутонах различных типов и количество сателлитных бутонов без активных зон, проводили сравнение площадей бутонов (различных типов) и плотность распределения активных зон в них. Длина нервного окончания измерялась в программе LAS X с помощью наложения на всё нервное окончание масштабной линейки, измеряющей автоматически длину отрезков в мкм. Для получения общей длины нервного окончания, суммировали длины всех отрезков. Подсчет количества активных зон на всё нервное окончание производили автоматически в программе Fiji, а также вручную. Количество активных зон на бутон и площадь бутона измерялись также в программе Fiji. Для измерения площади бутона аккуратно обводили бутон по его периметру с помощью инструмента Freehand selection.

Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ Origin 6.1 и STATISTICA 12. Достоверность различий между экспериментальными линиями и контролем определялась по критерию One-way ANOVA (Origin 6.1), U-критерию Манна – Уитни и критерию Колмогорова-Смирнова (STATISTICA 12). В таблицах 2, 3 и на рисунках 16, 19, 21, 22, 27 и 28 приведены средние значения со стандартной ошибкой среднего.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной линии было исследовано 19 нервных окончаний (5 личинок), в линии APP+BACE 28 нервных окончаний (11 личинок) и в линии A β с прямой экспрессией последовательности A β 30 нервных окончаний (12 личинок). На рис. 15 представлены примеры полученных изображений.

Проводился анализ структуры нервного окончания: оценивали среднюю длину нервного окончания, среднее число ветвлений и среднее количество синаптических бутонов Ib, Is типов, сателлитных бутонов, а также среднее количество бутонов всех типов на одном нервном окончании. Измеряли количество активных зон (АЗ) на все нервное окончание, а также независимо от типа бутона анализировали среднее количество активных зон на 1 бутон, среднюю площадь 1 бутона и плотность распределения активных зон в 1 бутоне. Полученные данные во всех трех линиях представлены в таблице 2.

Кроме того, в контрольной линии было проанализировано 345 бутонов Ib типа, 44 бутона Is типа, 4 бутона, тип которых установить не удалось (Ib или Is) и 37 сателлитных бутонов. В линии APP+BACE исследовали 629 бутонов Ib типа, 211 бутонов Is типа, 25 бутонов Ib или Is типов и 91 сателлитный бутон. В линии A β анализировали 610 бутонов Ib типа, 144 бутонов Is типа, 55 бутонов Ib или Is типов и 69 сателлитных бутонов (таблица 3).

Проанализировано среднее количество активных зон на 1 бутон Ib, Is типов и на 1 сателлитный бутон. Также проводили измерение средней площади 1 бутона Ib, Is типов и 1 сателлитного бутона и сравнивали плотность распределения активных зон в 1 бутоне Ib, Is типов и в 1 сателлитном бутоне. Полученные данные во всех трех исследованных линиях представлены в таблице 3.

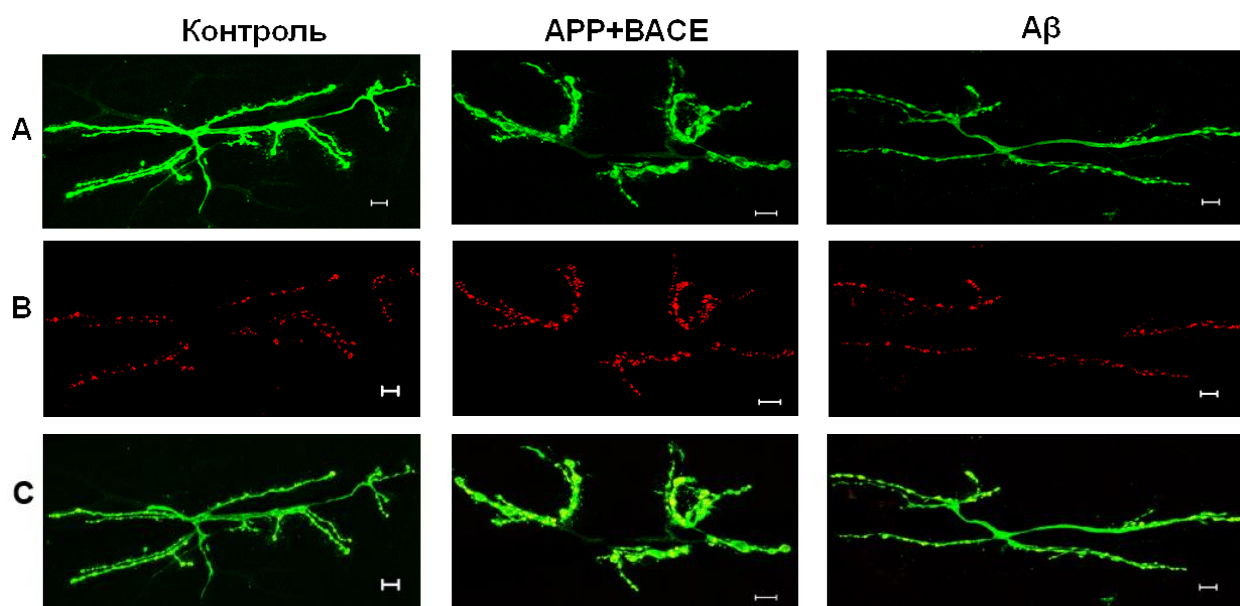


Рис. 15. Нервные окончания, иннервирующие 6/7 мышечные волокна: А. Нервное окончание, окрашенное anti-HRP, зеленый канал; В. Активные зоны, окрашенные ps-82, красный канал; С. Наложение красного и зеленого каналов. На рисунке показаны примеры изображения нервных окончаний в трех исследуемых линиях. Масштаб: 10 мкм.

Таблица 2. Характеристики нервного окончания личинки *Drosophila melanogaster*.

* - $p < 0.05$ (ANOVA; при сравнении с контролем), # - $p < 0.05$ (ANOVA; при сравнении с линией Aβ), ** - $p < 0.01$ (ANOVA; при сравнении с контролем), ## - $p < 0.01$ (ANOVA; при сравнении с линией Aβ), * - $p < 0.05$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с контролем), # - $p < 0.05$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с линией Aβ), ** - $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с контролем), ## - $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с линией Aβ):

Параметр	Контроль	APP+BACE	Aβ
Длина нервного окончания, мкм	368 ± 34	398 ± 17	410 ± 30
Число ветвлений	$6,8 \pm 0,6$	$8,9 \pm 0,5$ *, *	$9,0 \pm 0,8$
Общее число бутонов	$65,5 \pm 6,6$	$87,4 \pm 3,9$ **, **, #	$72,5 \pm 6,3$

Число Ib бутонов	53,4 ± 4,2	62,0 ± 3,9	56,2 ± 4,0
Число Is бутонов	6,7 ± 3,4	14,6 ± 2,6 *, #, #	7,6 ± 1,9
Число сателлитных бутонов	5,2 ± 0,9	8,7 ± 0,7 *, **, #, ##	5,5 ± 0,6
Количество АЗ на нервное окончание (Fiji)	326 ± 27	393 ± 22 **, #, #	325 ± 19
Количество АЗ на нервное окончание (вручную)	342 ± 22	383 ± 18	380 ± 17
Количество АЗ на нервное окончание (вручную по частям)	502 ± 25	522 ± 24	540 ± 23
Количество АЗ на 1 бутон (любого типа)	7,3 ± 0,2	4,9 ± 1,2 **, **, ##, ##	6,7 ± 1,2 *, **
Площадь бутона (любого типа)	4,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1 **, **, ##, ##	3,9 ± 0,1 **, **
Плотность распределения АЗ в 1 бутоне (любого типа)	1,75 ± 0,03	1,59 ± 0,02 **, **, ##, ##	1,94 ± 0,02 **, **
Количество волокон	19	28	30
Количество личинок	5	11	12
Общее количество проанализированных бутонов (Ib, Is, Ib+Is, сателлитные)	430	956	878

Таблица 3. Данные по количеству активных зон в 1 бутоне, по площади бутона и по распределению АЗ в 1 бутоне нервного окончания личинки *Drosophila melanogaster*. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ (ANOVA; при сравнении с контролем), ## - $p < 0.01$ (ANOVA; при сравнении с линией Аβ), * - $p < 0.05$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с

контролем), ** - $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с контролем), ## - $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни; при сравнении с линией Аβ):

Параметр	Контроль	APP+BACE	Aβ
Количество АЗ на 1 бутон Ib типа	$8,5 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,1$ **, **, ##, ##	$8,6 \pm 0,2$
Количество АЗ на 1 бутон Is типа	$2,9 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$ **, **, ##, ##	$2,3 \pm 0,1$ *, *
Количество АЗ на 1 сателлитный бутон	$1,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$ **, *	$1,6 \pm 0,1$
Площадь 1 бутона Ib типа	$5,2 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,1$ *, **, ##, ##	$5,2 \pm 0,1$
Площадь 1 бутона Is типа	$1,83 \pm 0,13$	$1,21 \pm 0,05$ **, **	$2,35 \pm 0,13$ **, **
Площадь 1 сателлитного бутона	$1,14 \pm 0,09$	$0,96 \pm 0,05$ ##	$0,80 \pm 0,06$ **, **
Плотность распределения АЗ в 1 бутоне Ib типа	$1,78 \pm 0,03$	$1,57 \pm 0,02$ *, **, ##, ##	$1,84 \pm 0,02$ *
Плотность распределения АЗ в 1 бутоне Is типа	$1,62 \pm 0,10$	$1,63 \pm 0,05$ ##, ##	$2,03 \pm 0,07$ **, **
Плотность распределения АЗ в 1 сателлитном бутоне	$1,60 \pm 0,14$	$1,46 \pm 0,10$ ##, ##	$2,22 \pm 0,12$ **, **
Количество проанализированных бутонов Ib типа	345	629	610
Количество проанализированных бутонов Is типа	44	211	144
Количество проанализированных сателлитных бутонов	37	91	69

Все полученные цифровые значения сконцентрированы в таблицах 2 и 3. Достоверных отличий в средней длине нервных окончаний (рис. 17 А) обнаружено не было, что не согласуется с ранее полученными данными на 4 мышечном волокне, где

наблюдалось достоверное увеличение длины нервного окончания в линии APP+BACE по сравнению с контролем и с линией Аβ (таблица 2; рис. 16 А). Это отличие от ранее полученных данных можно объяснить анализом различных мотонейронов: в данном случае иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна, а не 4 мышечное волокно. Однако существуют данные об изменении длины нервного окончания в зависимости от степени натяжения и фиксации нервного препарата. В связи с этим правильней измерять такой параметр, как число ветвлений. Количество ветвлений определяли по числу отростков, которые отходят от нервного окончания (рис. 17 В) (Саранцева и др., 2012).

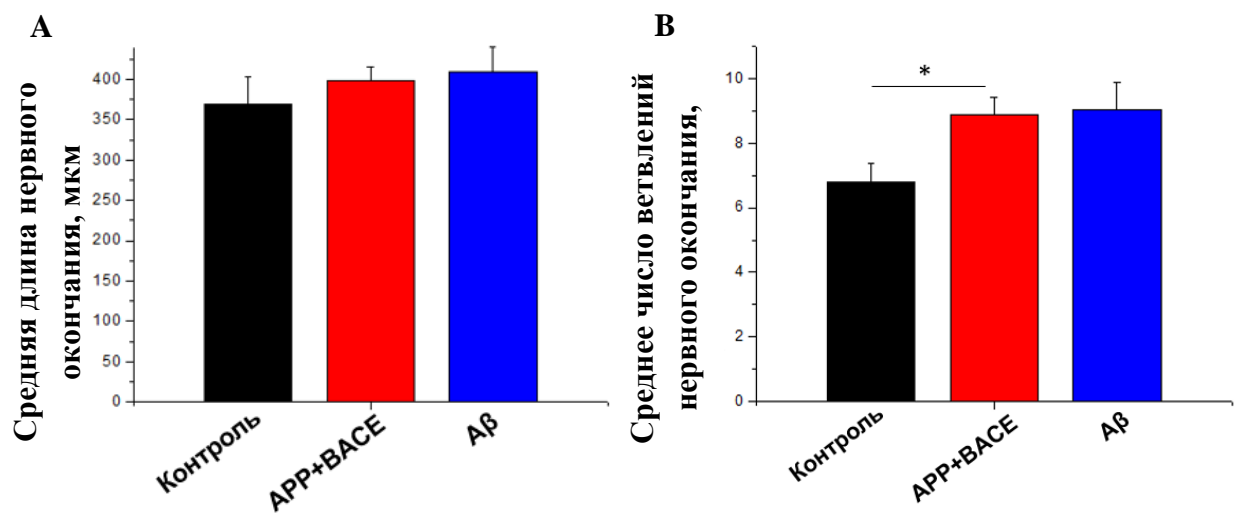


Рис. 16. А. Средняя длина нервного окончания, иннервирующего 6/7 мышечные волокна; В. Среднее число ветвлений в нервном окончании, иннервирующем 6/7 мышечные волокна. * $p < 0.05$ (ANOVA).

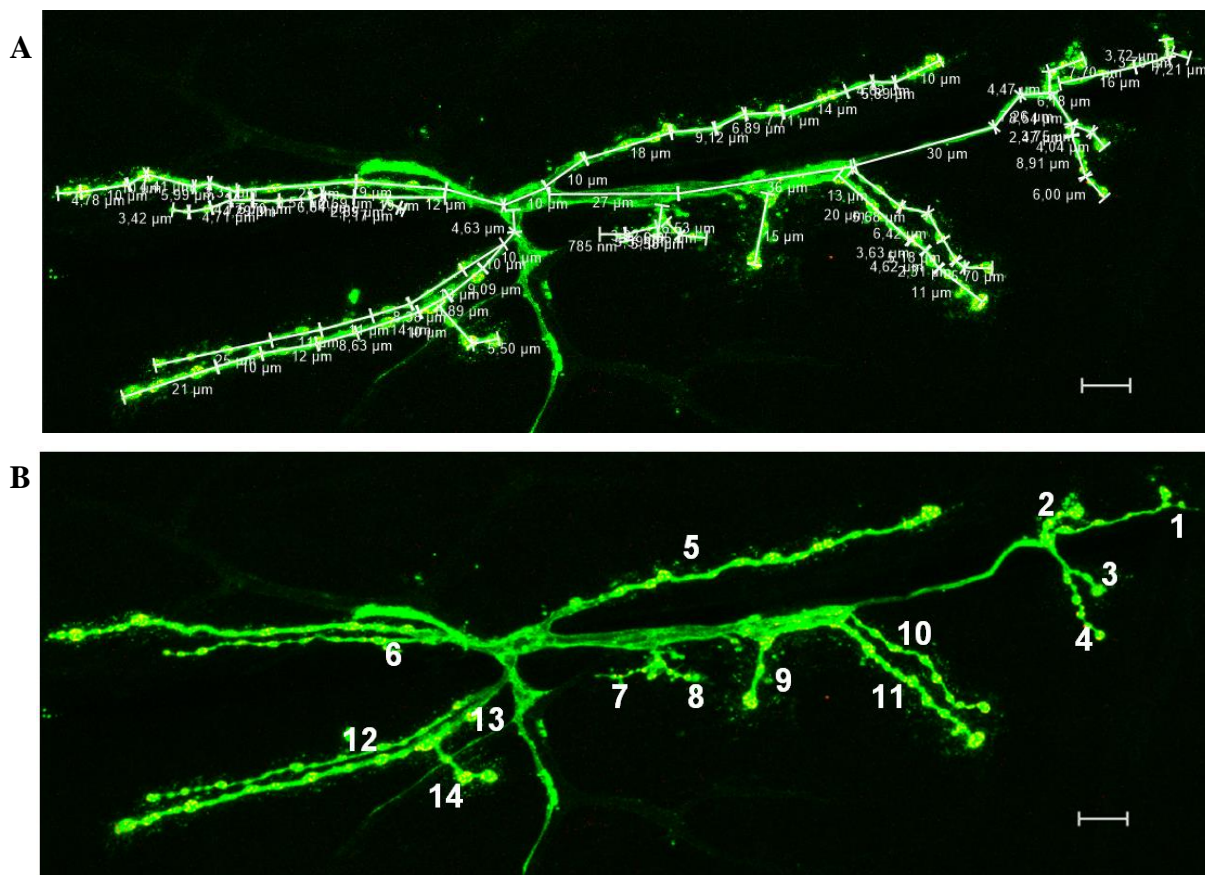


Рис. 17. А. Пример измерения длины нервного окончания. В. Пример подсчета количества ветвлений. Масштаб: 10 мкм.

Среднее число ветвлений в линии APP+BACE было достоверно ($p < 0.05$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) увеличено по сравнению с контролем. В линии A β достоверных отличий не обнаружено (таблица 2; рис. 16 В). Таким образом, только в линии APP+BACE наблюдалось достоверное отличие среднего числа ветвлений по сравнению с контролем, что отчасти не согласуется с ранее полученными данными по нервным окончаниям, иннервирующим 4 мышечное волокно, где наблюдалось значительное увеличение числа ветвлений в линии APP+BACE по сравнению с контролем и линией A β . Однако это вновь можно объяснить различием в анализируемых нервных окончаниях.

Другим важным показателем является количество синаптических бутонов на нервном окончании. 6 и 7 мышечные волокна иннервируются двумя аксонами с бутонами разных типов – Is и Ib. В работе проводили анализ двух типов нервных окончаний, несущих бутоны типа Ib или Is. Кроме того, анализировали количество сателлитных бутонов (рис. 18).

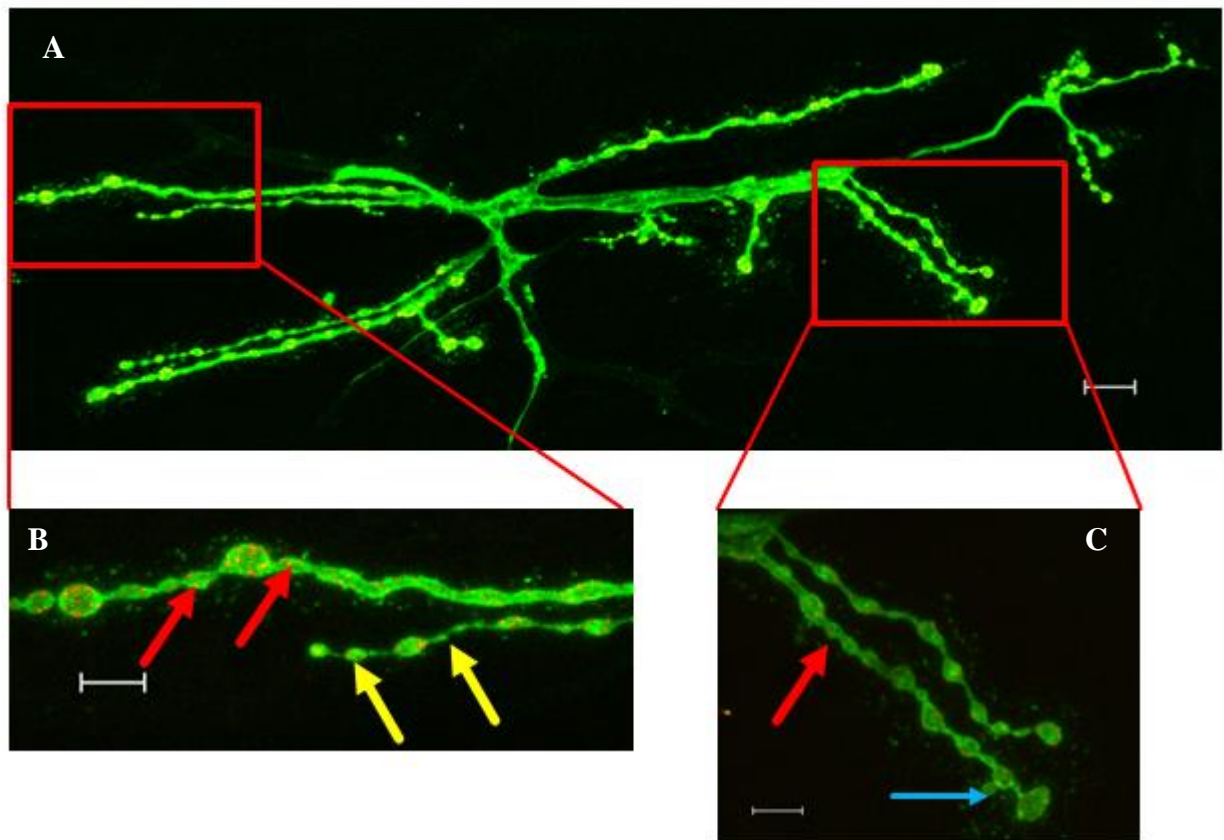


Рис. 18. Пример нервных окончаний, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна, несущих бутоны Ib (красная стрелка) и Is (желтая стрелка) типов, а также сателлитные (голубая стрелка) бутоны. Масштаб (А) – 10 мкм, масштаб (В и С) – 5 мкм.

Общее количество синаптических бутонов определялось суммой бутонов, которые несут два типа нервных окончаний с бутонами Ib и Is типов. В линии APP+BACE среднее число синаптических бутонов было достоверно выше по сравнению с контрольной линией ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) и с линией A β ($p < 0.05$ U-критерий Манна – Уитни). Линия A β достоверно не отличалась от контроля (таблица 2; рис. 19 А).

Таким образом, в линии APP+BACE, несмотря на отсутствие увеличения средней длины нервных окончаний, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна, а также достоверное увеличение числа ветвлений нервных окончаний по сравнению с контролем, но не с A β , было показано увеличение общего числа синаптических бутонов.

Проанализировали среднее количество синаптических бутонов Ib типа (таблица 2). Никаких достоверных отличий обнаружено не было, однако в линии APP+BACE наблюдалась тенденция к увеличению количества бутонов Ib типа по сравнению с контролем и линией A β (рис. 19 В).

Среднее количество Is бутонов в линии APP+BACE достоверно увеличивалось по сравнению с контролем ($p < 0.05$ U-критерий Манна – Уитни) и с линией A β ($p < 0.05$

ANOVA и U-критерий Манна – Уитни). В линии Аβ этот параметр достоверно не отличался от контроля (таблица 2; рис. 19 С). Однако стоит учесть, что данный параметр сложно учитывать, так как в некоторых анализируемых образцах из-за особенности препаровки отсутствовали нервные окончания, несущие бутоны Is типа.

Среднее количество сателлитных бутонов в линии APP+BACE достоверно ($p < 0.05$ ANOVA и $p < 0.01$ U-критерий Манна – Уитни) ниже относительно контроля и линии Аβ, тогда как в линии Аβ достоверных отличий по сравнению с контролем не обнаружено (таблица 2; рис. 19 D).

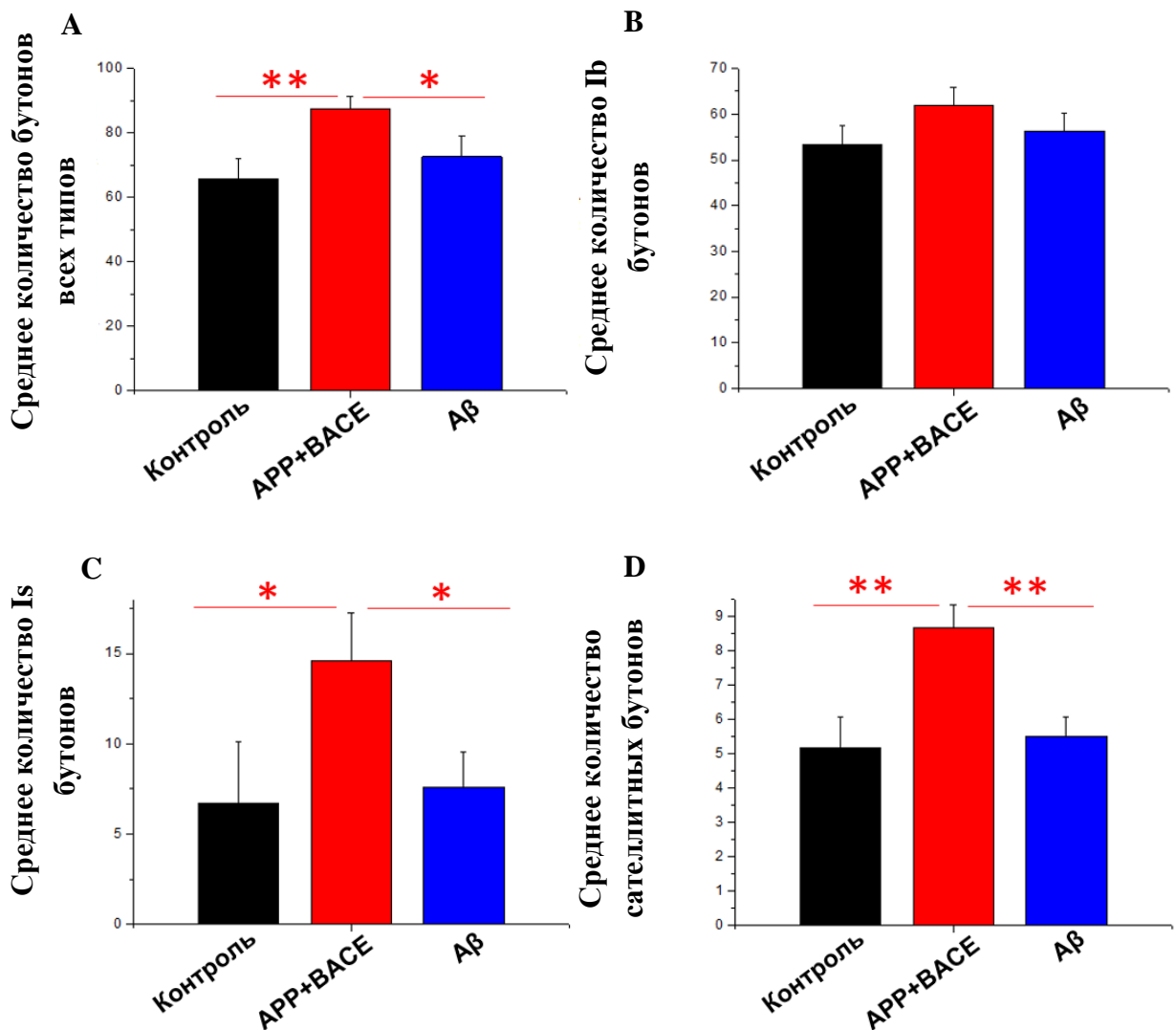


Рис. 19. А. Среднее общее число бутонов, которые несут нервные окончания двух типов, иннервирующие 6 и 7 мышечные волокна. В. Среднее количество бутонов Ib типа. С. Среднее количество бутонов Is типа. D. Среднее количество сателлитных бутонов. * $p < 0.05$ (U-критерий Манна – Уитни), ** $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни).

Проводили анализ в программе Fiji среднего количества активных зон, которые содержат нервные окончания, иннервирующие 6 и 7 мышечные волокна. На рис. 15 В

показаны целые нервные окончания с активными зонами, а на рис. 20 синаптические бутоны с активными зонами при приближении. В линии APP+BACE достоверно ($p < 0.01$ ANOVA) повышалось среднее количество активных зон по сравнению с контролем и в меньшей степени по сравнению с линией A β ($p < 0.05$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) (таблица 2; рис. 21 А).

При подсчете с помощью программы возможны неточности, так как при расположении нескольких активных зон на довольно близком расстоянии друг от друга программа может учесть это как одну активную зону. Поэтому более адекватным методом подсчета количества активных зон на нервные окончания будет подсчет их вручную.

При анализе среднего количества активных зон вручную никаких достоверных отличий не обнаружено (таблица 2; рис. 21 В). Как уже упоминалось ранее, для более точного анализа целое нервное окончание делили на 2-3 последовательных участка и снимали при приближении. Анализ данных снимков с увеличением позволил точнее проанализировать количество активных зон (таблица 2). Эти данные примерно в 1,4 раза превышают полученные при обсчете по снимку целого нервного окончания, однако достоверных отличий между контрольной и двумя трансгенными линиями не обнаружено (рис. 21 С). Эти данные совпадают с данными из литературы (Mhatre et al., 2014).

Таким образом, несмотря на общее увеличение количества синаптических бутонов, количество активных зон остается прежним, при этом отсутствие изменений в количестве активных зон согласуется с ранее полученными данными (Mhatre et al., 2014). Так как количество бутонов увеличивается, но число активных зон остается прежним, то можно предположить изменение их распределения в бутоне. Для этого необходимо определить среднее количество активных зон на один бутон и площадь этого бутона.

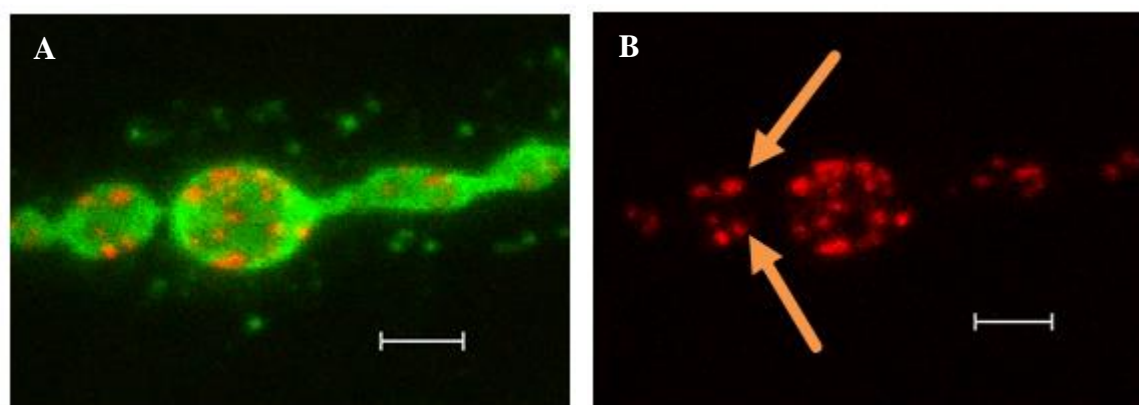


Рис. 20. А. Синаптические бутоны нервного окончания (зеленый канал) с активными зонами (красный канал). В. Активные зоны (показаны стрелками). Масштаб: 2 мкм.

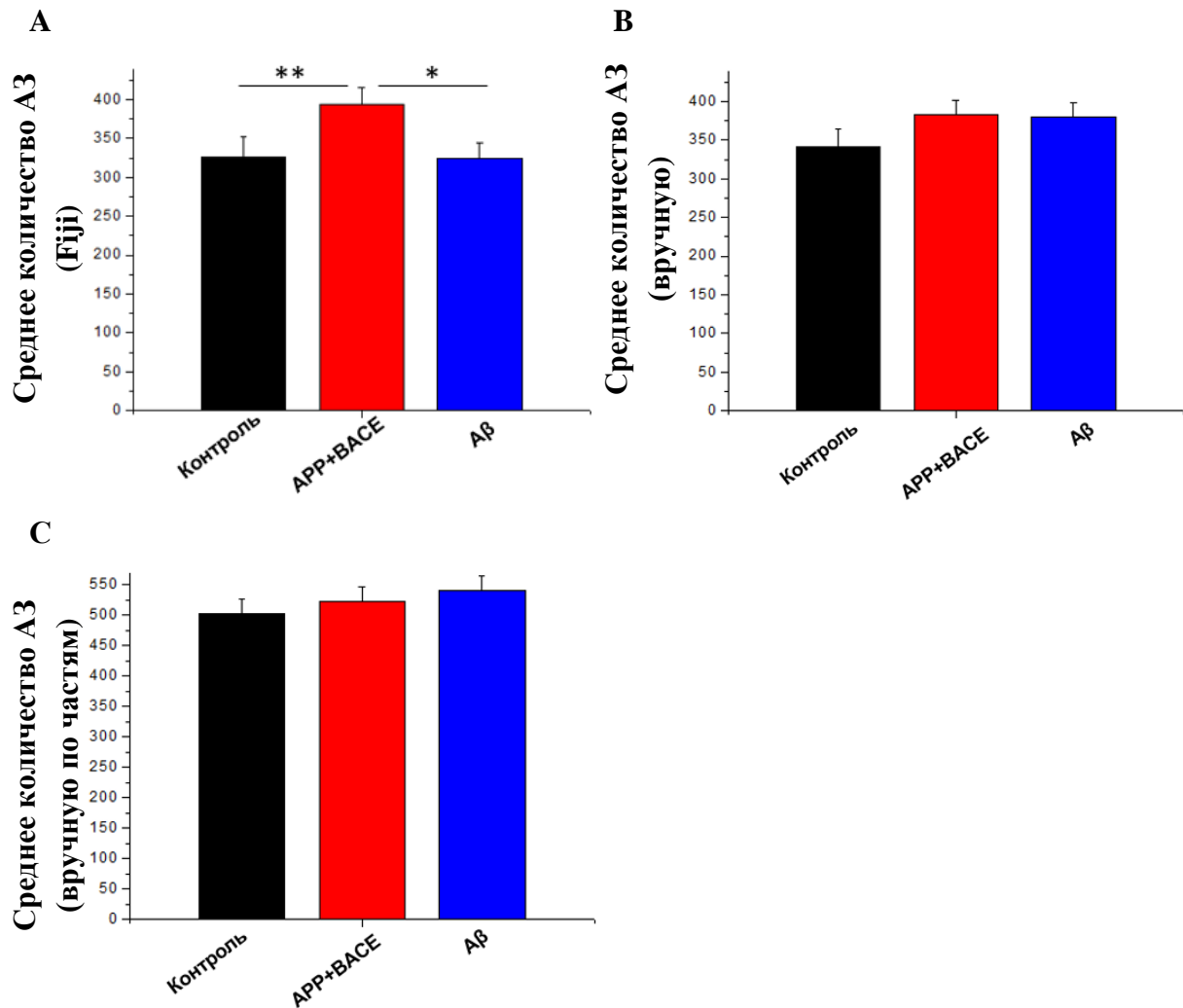


Рис. 21. А. Среднее количество активных зон в нервных окончаниях, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна, подсчитанное в программе Fiji. В. Среднее количество активных зон в нервных окончаниях, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна, подсчитанное вручную. С. Среднее количество активных зон, подсчитанное вручную по последовательным снимкам с увеличением. * $p < 0.05$ (ANOVA), ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Проанализировали среднее количество активных зон на 1 бутон независимо от его типа во всех исследуемых линиях (таблица 2; рис. 22 А). В линии APP+BACE показано достоверное снижение этого параметра ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) по сравнению с контролем и линией Аβ. Среднее количество активных зон на 1 бутон в линии Аβ было достоверно ($p < 0.05$ ANOVA и $p < 0.01$ U-критерий Манна – Уитни) снижено по сравнению с контрольной линией. Таким образом, в случае с количеством активных зон на один бутон независимо от его типа в линиях APP+BACE и Аβ наблюдали уменьшение их числа. Можно предположить, что и Аβ, и APP могут вносить свой вклад в

изменение количества активных зон на синаптический бутон. Однако морфология (длина, число ветвлений, общее число синаптических бутонов, а также количество активных зон нервных окончаний) в линии Аβ не изменялась по сравнению с контролем, в отличие от линии APP+BACE, в которой уменьшение количества активных зон на 1 бутон можно связать с тем, что общее число бутонов увеличилось, а общее количество активных зон осталось без изменений.

Далее проводили анализ среднего количества активных зон на один синаптический бутон Ib типа (таблица 3; рис. 22 В). В линии APP+BACE наблюдалось достоверное ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) снижение количества активных зон на бутон Ib типа по сравнению с контролем и линией Аβ, тогда как линия Аβ достоверно не отличалась от контроля.

При анализе среднего количества активных зон на один синаптический бутон Is типа (таблица 3; рис. 22 С) в линии APP+BACE наблюдалось достоверное ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) снижение данного параметра по сравнению с контролем и линией Аβ, также линия Аβ в меньшей степени, но достоверно ($p < 0.05$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) отличалась от контроля.

В линии APP+BACE показано достоверное ($p < 0.01$ ANOVA и $p < 0.05$ U-критерий Манна – Уитни) снижение среднего количества активных зон на один сателлитный бутон (таблица 3; рис. 22 D). Линия Аβ достоверно не отличалась ни от контрольной линии, ни от линии APP+BACE.

Кроме того, в линии APP+BACE 15,4% сателлитных бутонов не содержали активных зон, тогда как в контроле и в линии Аβ таких сателлитных бутонов было 5,4% и 7,2% соответственно, что в 2-3 раза меньше по сравнению с линией APP+BACE (рис. 24 В).

Таким образом, в линии APP+BACE во всех случаях обнаружено снижение количества активных зон на один бутон. Однако данные о вкладе в этот процесс β-амилоида несколько противоречивые: в одних бутонках наблюдалось влияние Аβ независимо от APP на снижение числа активных зон, тогда как в других отличий не было обнаружено.

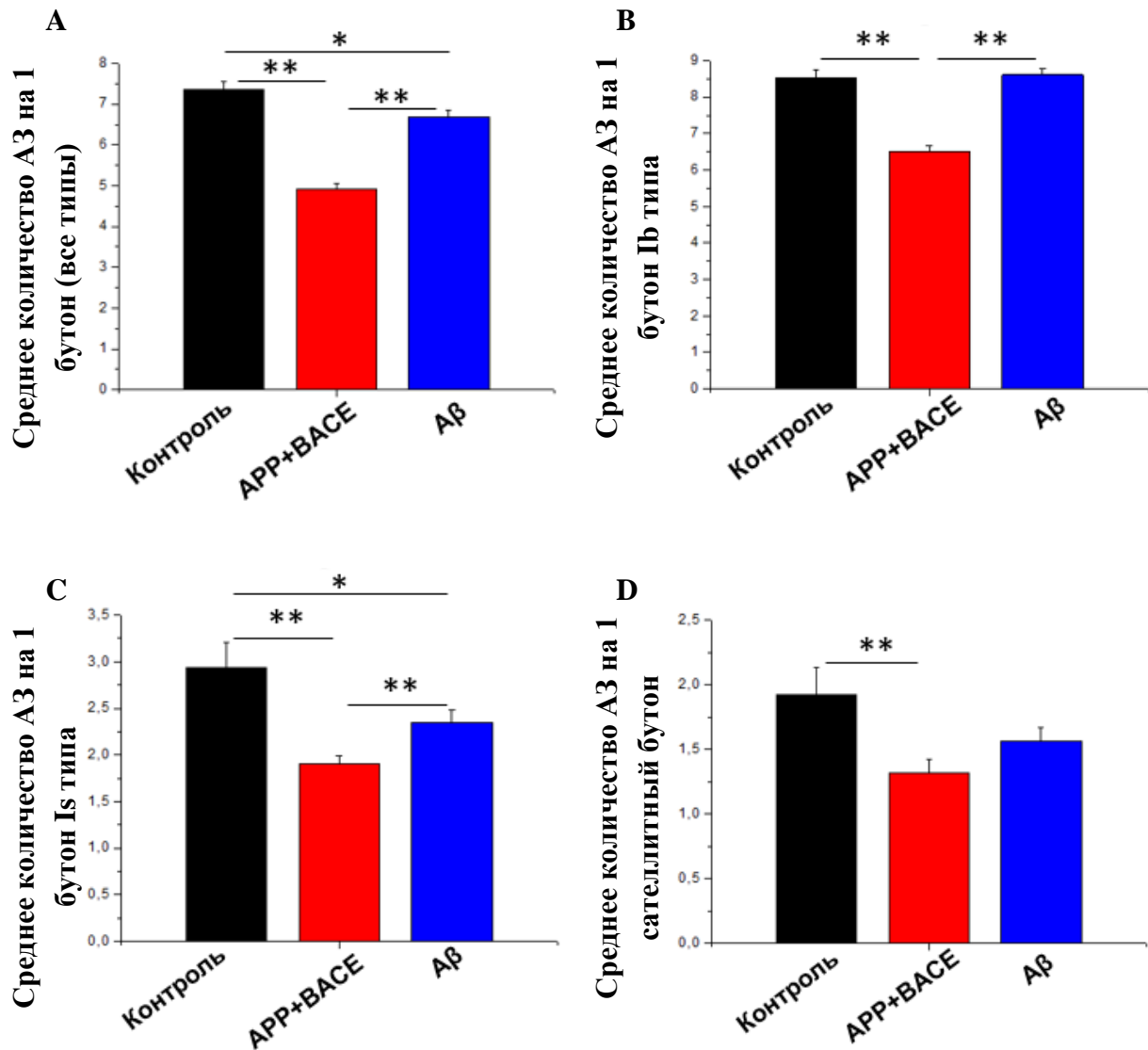


Рис. 22. А. Среднее количество активных зон на 1 бутон (независимо от типа). В. Среднее количество активных зон на 1 бутон Ib типа. С. Среднее количество активных зон на 1 бутон Is типа. Д. Среднее количество активных зон на 1 сателлитный бутон. * $p < 0.05$ (ANOVA), ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Кроме того, построили гистограммы с распределением активных зон на 1 синаптический бутон для Ib типа и сателлитных бутонов (рис. 24), для Is типа (рис. 23 В), для суммарного количества Ib и Is бутонов (рис. 23 А), а также кумулятивные кривые для Ib и Is (рис. 25). Показано, что количество активных зон в одном бутоне Ib и Is типов и соответствующие кумулятивные кривые в линии APP+BACE достоверно ($p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова)) отличаются по сравнению с контролем и линией Aβ. Кроме того, для линии Aβ также показано достоверное ($p < 0.01$ (критерий Колмогорова-Смирнова)) отличие по сравнению с контролем.

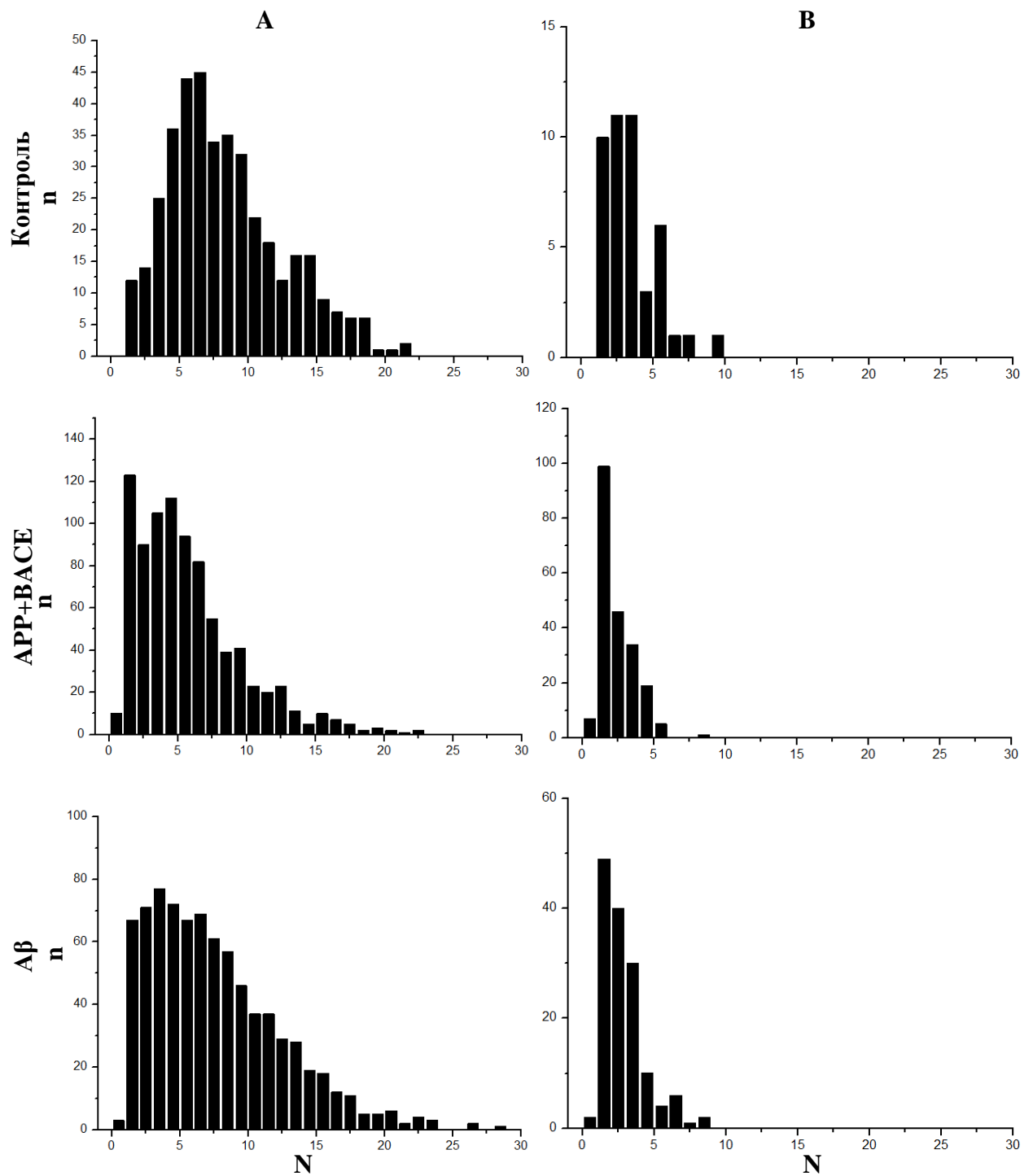


Рис. 23. Нервное окончание, иннервирующее 6 и 7 мышечные волокна. Показаны три линии: контроль, APP+BACE и A β . А. Распределение количества активных зон в одном бутоне типов Ib и Is. В. Распределение количества активных зон в одном бутоне Is типа. N - количество активных зон на 1 синаптический бутон.

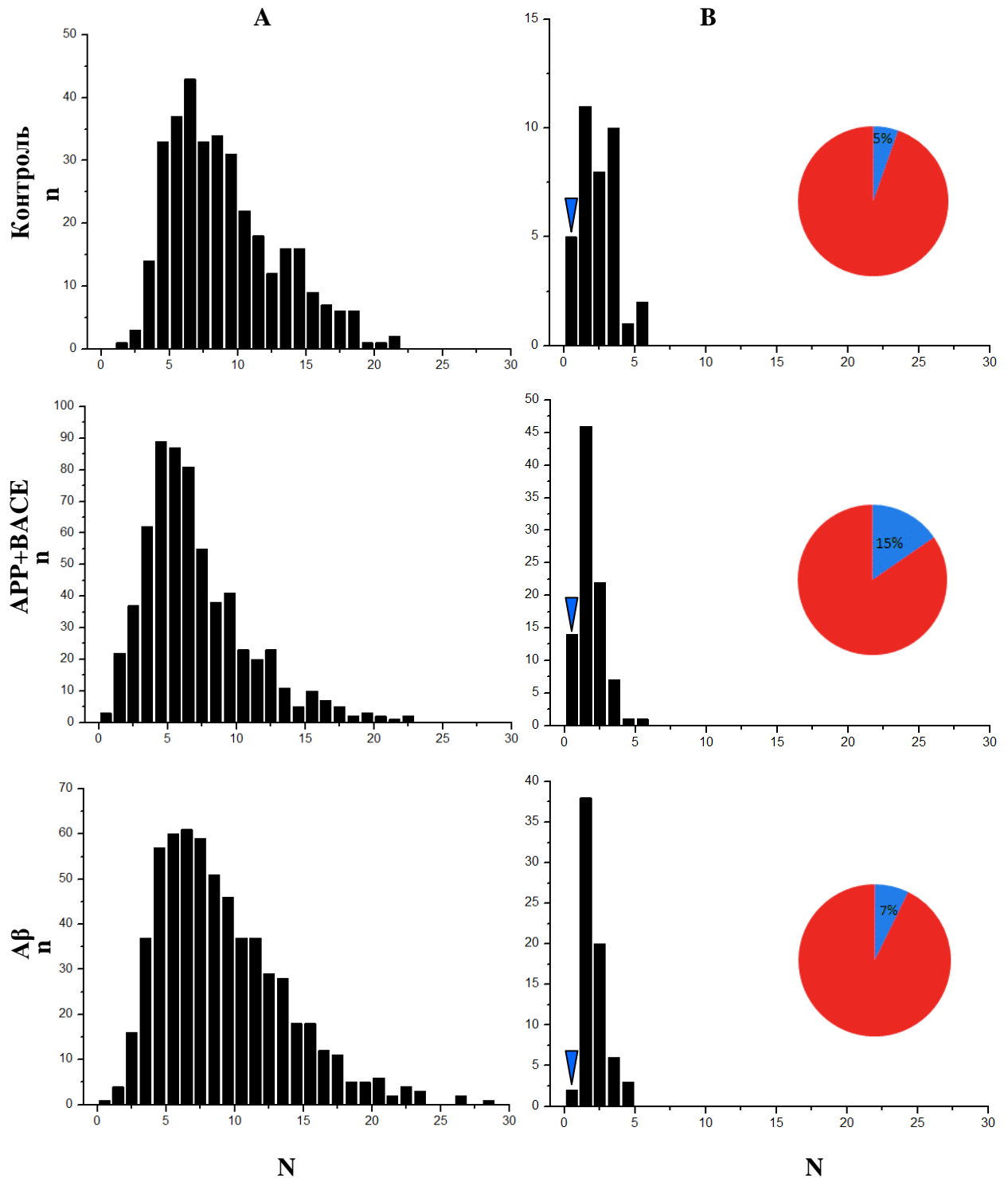


Рис. 24. Нервное окончание, иннервирующее 6 и 7 мышечные волокна. Распределение количества активных зон в 1 бутоне (Ib тип и сателлитные). Показаны три линии: контроль, APP+BACE и Aβ. А. Бутон Ib типа. В. Сателлитные бутон; стрелками показаны бутон, которые не содержат активных зон. Диаграммы показывают процент сателлитных бутонов без активных зон. N - количество активных зон на 1 синаптический бутон.

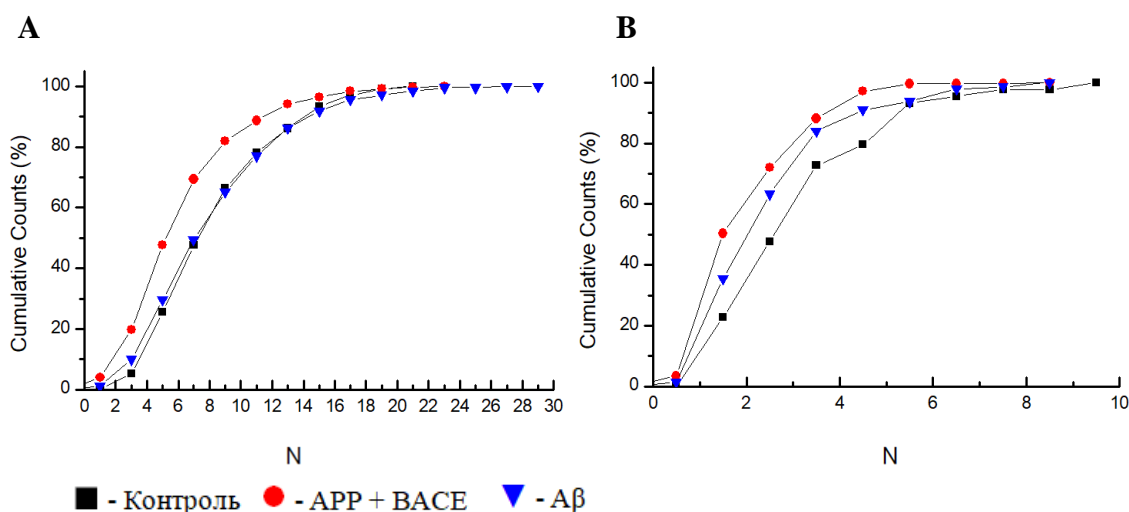


Рис. 25. Кумулятивные кривые количества активных зон на один бутон. А. Кумулятивные кривые для бутонов Ib типа. В. Кумулятивные кривые для бутонов Is типа.

Для определения эффекта APP и β -амилоида на распределение активных зон в бутоне необходимо измерить среднюю площадь бутонов (рис. 26). В линии APP+BACE этот показатель достоверно ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) ниже в сравнении с контролем и линией A β . Линия с прямой экспрессией последовательности β -амилоида также отличалась от контрольной линии по этому показателю: средняя площадь бутонов ниже ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) по сравнению с данными, полученными в контроле (таблица 2; рис. 27 А). Таким образом, при анализе средней площади бутонов одновременно всех типов можем наблюдать, что и APP, и A β оказывают влияние на этот параметр в сторону его уменьшения. Вероятно, в линии APP+BACE вклад вносит и APP, и образующийся с помощью протеолитического процессинга β - и γ -секретазами A β , так как наблюдали более сильное снижение средней площади бутона.

В бутонах Ib типа также происходило изменение средней площади бутона. В линии APP+BACE показано достоверное снижение по сравнению с контролем ($p < 0.05$ ANOVA и $p < 0.01$ U-критерий Манна – Уитни) и с линией A β ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни). В это же время линия A β не отличалась от контроля (таблица 3; рис. 27 В).

По полученным данным в линии APP+BACE происходит достоверное ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) снижение средней площади бутона Is типа по сравнению с контролем, а в линии A β наоборот происходит достоверное ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) увеличение этого параметра по сравнению с контролем (таблица 3; рис. 27 С).

В линии A β средняя площадь сателлитных бутонов достоверно ниже по сравнению с контролем ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) и с линией APP+BACE ($p < 0.01$ U-критерий Манна – Уитни) (таблица 3; рис. 27 D).

Таким образом, в случае со средней площадью бутонов всех типов вклад вносят и APP, и A β в сторону снижения этого параметра, однако эффект в линии APP+BACE выражен сильнее. В бутонах типа Ib вклад в снижение средней площади бутона вносил только APP, так как в линии A β отличий не обнаружено. Сравнение площадей бутонов Is типов представило совсем другие данные: и линия APP+BACE, и линия A β достоверно отличались от контроля, но не между собой. Кроме того, эффект APP+BACE показан в сторону снижения площади, а для A β – в сторону повышения средней площади. В сателлитных бутонах прямая экспрессия белка β -амилоида приводила к значительному снижению площади бутона по сравнению с контролем и линией APP+BACE.

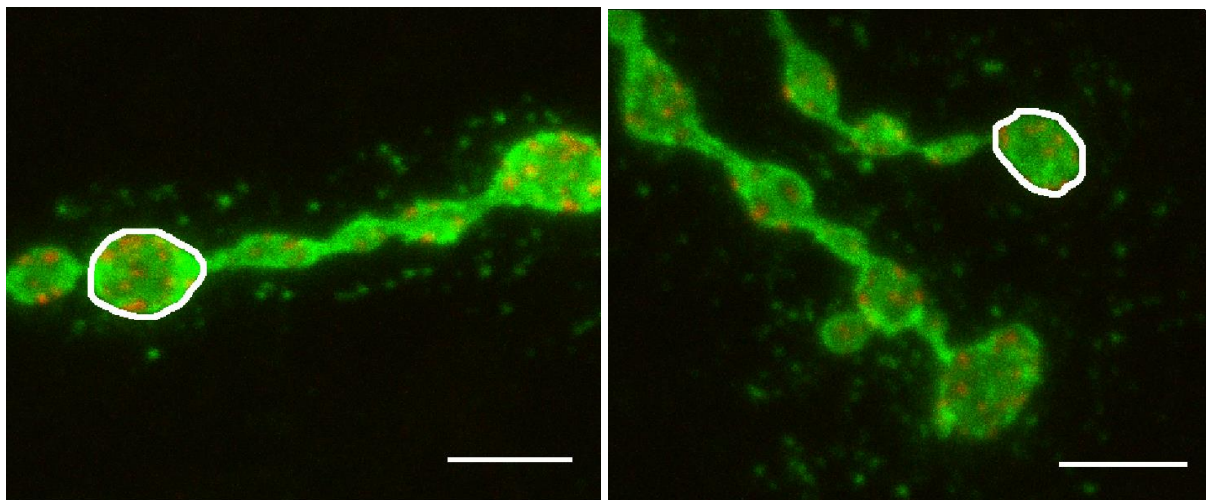


Рис. 26. Примеры изображений измерения площади бутонов. Масштаб 4 мкм.

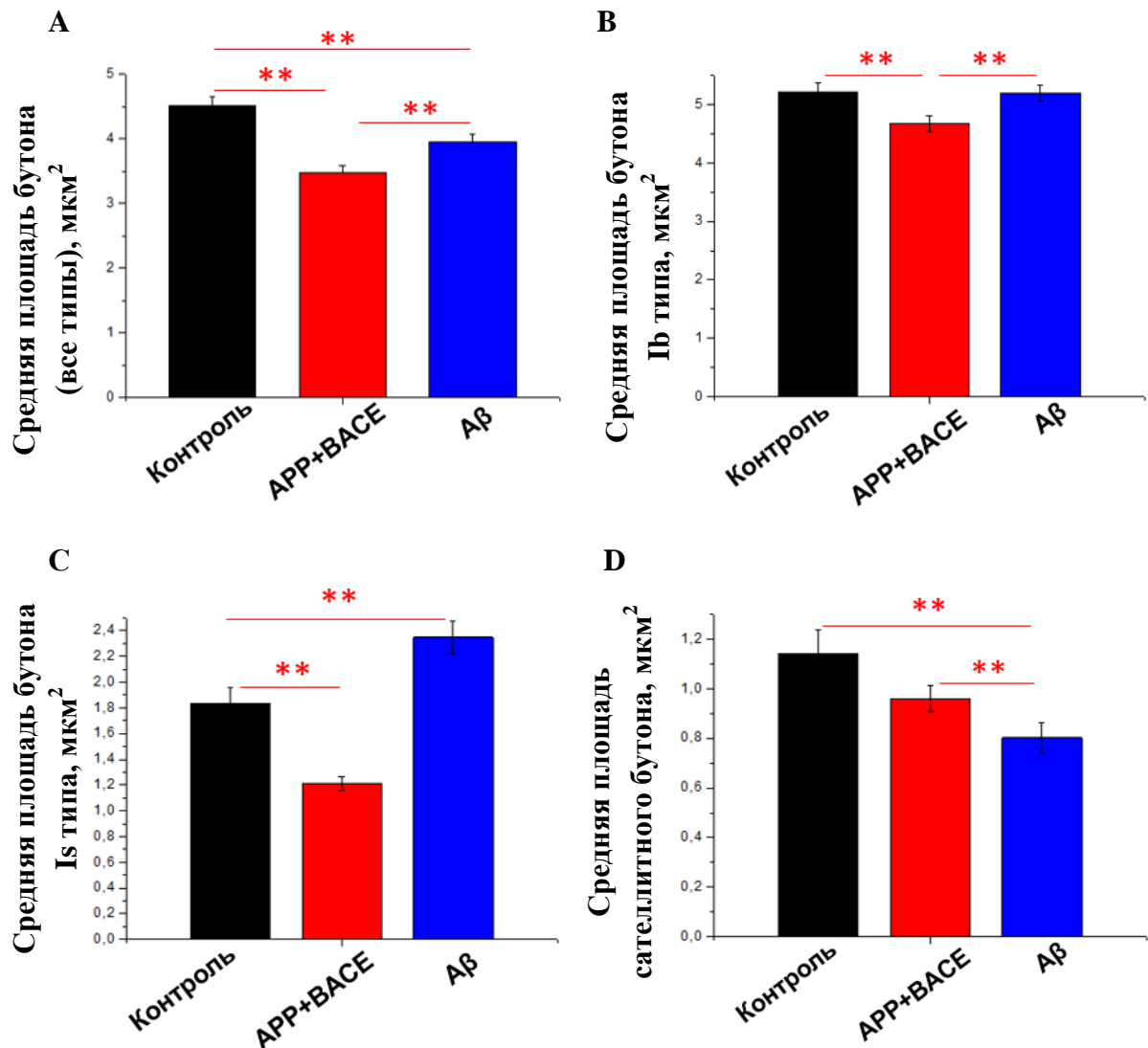


Рис. 27. А. Средняя площадь бутона независимо от типа, мкм². В. Средняя площадь бутона Ib типа, мкм². С. Средняя площадь бутона Is типа, мкм². D. Средняя площадь сателлитного бутона, мкм². ** $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни).

Плотность распределения активных зон считали по отношению количества активных зон на 1 бутон к площади этого бутона. Плотность распределения активных зон в 1 бутоне независимо от его типа в линии APP+BACE достоверно ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) ниже по сравнению с контролем и линией Aβ. В линии Aβ наблюдали достоверное ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) увеличение плотности распределения активных зон по сравнению с контролем (таблица 2; рис. 28 А).

В бутонах Ib типа плотность распределения активных зон на 1 бутон в линии APP+BACE была достоверно снижена по сравнению с контролем и линией Aβ ($p < 0.01$ ANOVA). Одновременно с этим, в линии Aβ плотность распределения активных зон на 1

бутон Ib типа была достоверно ($p < 0.01$ U-критерий Манна – Уитни) выше по сравнению с контролем (таблица 3; рис. 28 B).

Плотность распределения активных зон в 1 бутоне Is типа в линии A β достоверно ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) выше по сравнению с контролем и линией APP+BACE. Линия APP+BACE по этому параметру от контроля не отличалась (таблица 3; рис. 28 C).

Плотность распределения активных зон в 1 сателлитном бутоне в линии A β достоверно ($p < 0.01$ ANOVA и U-критерий Манна – Уитни) выше по сравнению с контролем и линией APP+BACE, тогда как в линии APP+BACE отличий от контроля не обнаружено (таблица 3; рис. 28 D).

Мы предполагали, что в связи с увеличением количества синаптических бутонов, но с сохранением количества активных зон во всем нервном окончании в линии APP+BACE происходит изменение распределения активных зон в синаптическом бутоне в сторону снижения их количества, что может объяснить снижение частоты спонтанной квантовой секреции медиатора. Плотность распределения активных зон в бутонах Ib типа также снижалась в линии APP+BACE. При одновременном анализе бутонов всех типов в линии A β происходит сохранение количества бутонов и активных зон при сравнении с контролем, однако небольшое (по сравнению с линией APP+BACE) снижение среднего количества активных зон на бутон, уменьшение площади бутона, но увеличение плотности распределения активных зон в бутоне. Кроме того, при анализе бутонов Ib типа наблюдалось достоверное увеличение плотности распределения активных зон. Плотность распределения активных зон увеличивалась и в Is, и в сателлитных бутонах по сравнению с контролем и линией APP+BACE. Таким образом, поскольку именно в линии APP+BACE было ранее обнаружено снижение частоты спонтанной квантовой секреции медиатора, а не в линии с прямой экспрессией последовательности A β , то в соответствии с нашими данными об уменьшении плотности распределения активных зон на 1 бутон в этой линии, а не в линии A β , именно APP вызывает снижение плотности распределения активных зон в бутоне, что способствует нарушению процесса экзоцитоза, выражающегося в снижении частоты спонтанной квантовой секреции медиатора.

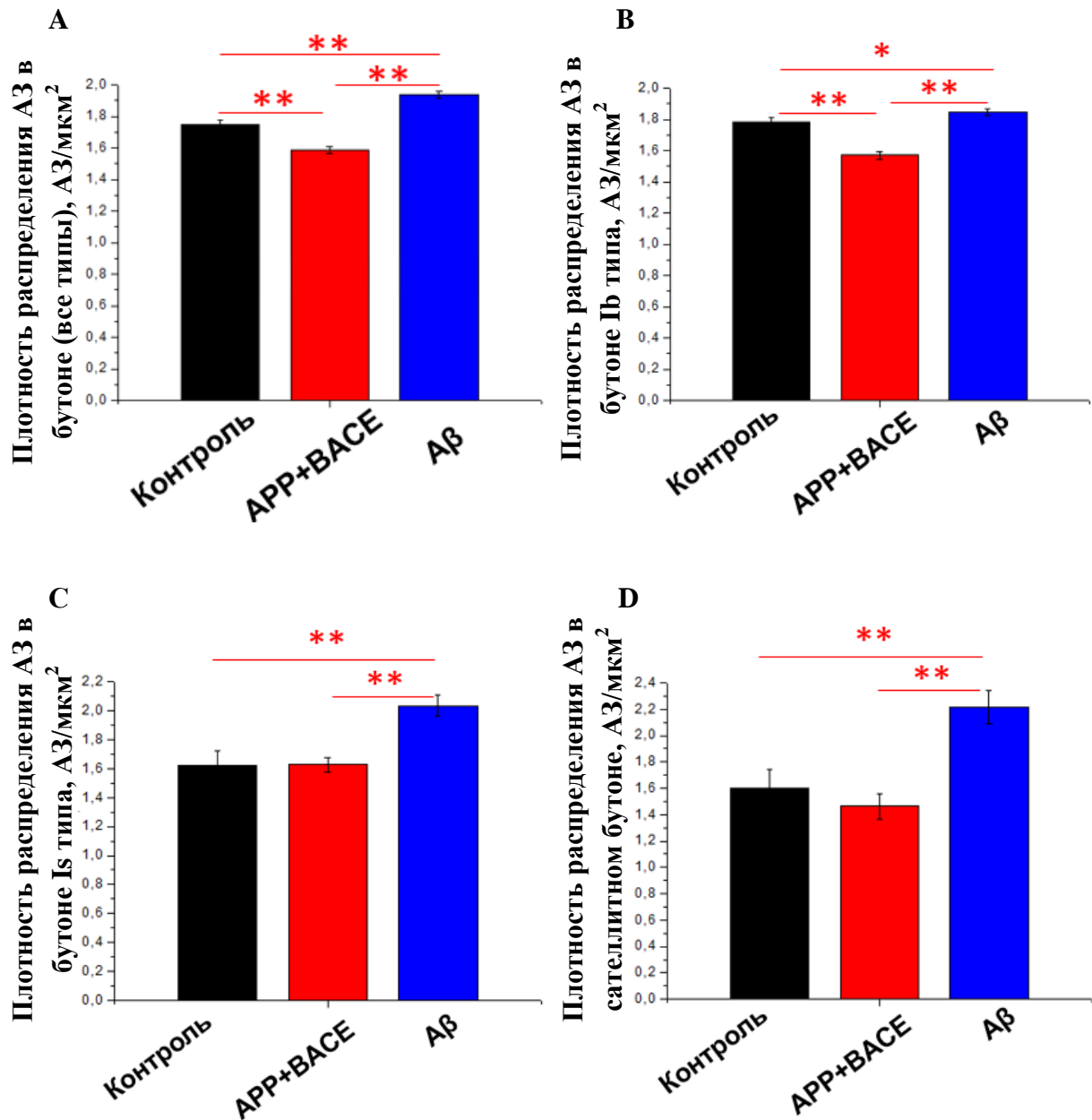


Рис. 28. А. Плотность распределения активных зон в бутонах независимо от их типа, АЗ/мкм². В. Плотность распределения активных зон в бутонах Ib типа, АЗ/мкм². С. Плотность распределения активных зон в бутонах Is типа, АЗ/мкм². Д. С. Плотность распределения активных зон в сателлитных бутонах, АЗ/мкм². * $p < 0.05$ (U-критерий Манна – Уитни), ** $p < 0.01$ (U-критерий Манна – Уитни).

4. ВЫВОДЫ

1. В условиях ко-экспрессии генов *APP* и β -секретазы человека наблюдалось увеличение количества синаптических бутонов и общего количества активных зон в нервных окончаниях, иннервирующих 6 и 7 мышечные волокна личинки *Drosophila melanogaster*.
2. Наблюдаемые изменения сопровождались снижением числа активных зон в индивидуальных бутонах и площади бутонов.
3. При прямой экспрессии β -амилоида человека анализируемые параметры не отличались от контрольных, что указывает на специфичность наблюдаемых эффектов для APP.
4. Полученные данные свидетельствуют о возможной роли белка-предшественника амилоида (APP) в структурной и функциональной организации активной зоны у *Drosophila melanogaster*.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зефирова А. Л., Петров А. М. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо – эндоцитозный цикл). Казань: Арт-кафе. 324с. 2010.
2. Мухамедьяров М. А., Зефирова А. Л. Влияние β -амилоидного пептида на функции возбудимых тканей: физиологические и патологические аспекты. Успехи Физиологических наук. Том 44. №1. стр. 55-71. 2013.
3. Сабурова Е.А., Васильев А.Н., Кравцова В.В., Большакова О.И., Саранцева С.В., Кривой И.И. Спонтанная активность в нервно-мышечном синапсе личинки *Drosophila melanogaster* при экспрессии гена *APP* человека. Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2, стр. 90 – 98. 2015.
4. Саранцева С.В., Кислик Г.А., Ткаченко Н.А., Васильев А.Н., Шварцман А.Л. Морфологические и функциональные нарушения в нейромышечных контактах *Drosophila melanogaster*, вызванные экспрессией гена *APP* человека. Цитология. 54 (5): 421-429. 2012.
5. Ackermann F., Waites C.L., Garner C.C. Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. EMBO Rep. 16 (8): 923-938. 2015.
6. Astorga C., Jorquera R.A., Ramírez M., Kohler A., López E., Delgado R., Córdova A., Olguín P., Sierralta J. Presynaptic DLG regulates synaptic function through the localization of voltage-activated Ca^{2+} Channels. Scientific Reports. 6, 32132. 2016.
7. Atwood H. L., Govind C. K., Wu C.-F. Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. J. Neurobiol. 24 (8): 1008-1024. 1993.
8. Ball R., Xing B., Bonner P., Shearer J., Cooper R.L. Long-term *in vitro* maintenance of neuromuscular junction activity of *Drosophila* larval. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 134: 247 – 255. 2003.
9. Bayer T. A., Wirths O. Intracellular accumulation of amyloid-Beta – a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer’s disease. Frontiers in aging neuroscience. V. 2. № P. 8. 2010.
10. Ben Khalifa N., Tyteca D., Courtot P.J., Renauld J.C., Constantinescu S.N., Octave J.N., Kienlen-Campard P. Contribution of Kunitz Protease Inhibitor and Transmembrane Domains to Amyloid Precursor Protein Homodimerization. Neurodegener Dis. 10 (1-4): 92 – 95. 2012.
11. Bennett D., Lyulcheva E., Cobbe N. *Drosophila* as a Potential Model for Ocular Tumors. Ocul Oncol Pathol. 1: 190 – 199. 2015.

12. Bignante E.A., Heredia F., Morfini G., Lorenzo A. Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β -induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 34 (11): 2525-2537. 2013.
13. Blake M.R., Holbrook S.D., Kotwica-Rolinska J., Chow E.S., Kretzschmar D., Giebltowicz J.M. Manipulations of Amyloid Precursor Protein Cleavage Disrupt the Circadian Clock in Aging *Drosophila*. *Neurobiol Dis*. 77: 117 – 126. 2015.
14. Blunk A.D., Akbergenova Y., Cho R.W., Lee J., Walldorf U., Xu K., Zhong G., Zhuang X., Littleton J.T. Postsynaptic actin regulates active zone spacing and glutamate receptor apposition at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci*. 61: 241-254. 2014.
15. Bode D.C., Baker M.D., Viles J.H. Ion Channel Formation by Amyloid- β 42 Oligomers but not Amyloid- β 40 in Cellular Membranes. *J Biol Chem*. 292 (4): 1404 – 1413. 2016.
16. Bolkan B.J., Triphan T., Kretzschmar D. β -secretase cleavage of the fly Amyloid Precursor Protein is required for glial survival. *J Neurosci*. 32 (46): 16181 – 16192. 2012.
17. Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118: 401- 415. 1993.
18. Bucher D. An electrophysiological analysis of synaptic transmission at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2008.
19. Cárdenas-Aguayo M. d. C., Silva-Lucero M. d. C., Cortes-Ortiz M., Jiménez-Ramos B., Gómez-Virgilio L., Ramírez-Rodríguez G., Vera-Arroyo E., Fiorentino-Pérez R., García U., Luna-Muñoz J., Meraz-Ríos M.A. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. *Neurochemistry*. 1 – 25. 2014.
20. Carrillo-Mora P., Luna R., Colin-Barenque L. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 795375. P. 15. 2014.
21. Cassagnes L.E., Hervé V., Nepveu F., Hureau C., Faller P., Collin F. The Catalytically Active Copper-Amyloid-Beta State: Coordination Site Responsible for Reactive Oxygen Species Production. *Angew Chem Int Ed Engl*. 52 (42): 11110 – 11113. 2013.
22. Cassar M., Kretzschmar D. Analysis of Amyloid Precursor Protein Function in *Drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci*. 9: 61. 2016.
23. Chakraborty R., Vepuri V., Mhatre S. D., Paddock B. E., Miller S., Michelson S. J., Delvadia R., Desai A., Vinokur M., Melicharek D. J., Utreja S., Khandelwal P., Ansaloni S., Goldstein L.E., Moir R.D., Lee J.C., Tabb L.P., Saunders A.J., Marenda D.R.

- Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. PLoS ONE. 6 (6): e20799. 2011.
24. Chen G.F., Xu T.H., Yan Y., Zhou Y.R., Jiang Y., Melcher K., Xu H.E. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacol Sin. 38 (9): 1205 – 1235. 2017.
 25. Cheng L., Locke C., Davis G.W. S6 kinase localizes to the presynaptic active zone and functions with PDK1 to control synapse development. J Cell Biol. 194 (6): 921 – 935. 2011.
 26. Chua L.M., Lim M.L., Wong B.S. The Kunitz-protease inhibitor domain in amyloid precursor protein reduces cellular mitochondrial enzymes expression and function. Biochem Biophys Res Commun. 437 (4): 642 – 647. 2013.
 27. Clarke G.L., Chen J., Nishimune H. Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. Front Mol Neurosci. 5: 12. 2012.
 28. Collins C. A., DiAntonio A. Synaptic development: insights from *Drosophila*. Curr. Opin. Neurobiol. 17 (1): 35 – 42. 2007.
 29. Coronel R., Bernabeu-Zornoza A., Palmer C., Muñiz-Moreno M., Zambrano A., Cano E., Liste I. Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. Mol Neurobiol. 2018.
 30. Coyle I.P., Koh Y.H., Lee W.C., Slind J., Fergestad T., Littleton J.T., Ganetzky B. Nervous Wreck, an SH3 Adaptor Protein that Interacts with Wsp, Regulates Synaptic Growth in *Drosophila*. Neuron. 41 (4): 521 – 534. 2004.
 31. Davis C.H., Berkowitz M.L. Interaction between amyloid-beta (1-42) peptide and phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. Biophys J. 96 (3): 785-797. 2009.
 32. Dawkins E., Small D.H. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. J Neurochem. 129 (5): 756-769. 2014.
 33. De Strooper B., Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. J. Cell Sci. 113: 1857 – 1870. 2000.
 34. Denker A., Krohner K., Rizzoli S.O. Revisiting synaptic vesicle pool localization in the *Drosophila* neuromuscular junction. J. Physiol. 587 (12): 2919 – 2926. 2009.
 35. Dobi K.C., Schulman V.K., Baylies M.K. Specification of the somatic musculature in *Drosophila*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 4 (4): 357-375. 2015.
 36. Ehmann N., van de Linde S., Alon A., Ljaschenko D., Keung X.Z., Holm T., Rings A., DiAntonio A., Hallermann S., Ashery U., Heckmann M., Sauer M., Kittel R.J.

- Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states. *Nat Commun.* 5: 4650. 2014.
37. Fang L., Duan J., Ran D., Fan Z., Yan Y., Huang N., Gu H., Zhu Y. Amyloid- β depresses excitatory cholinergic synaptic transmission in *Drosophila*. *Neurosci Bull.* 28 (5): 585 – 594. 2012.
 38. Ferreira S.T., Lourenco M.V., Oliveira M.M., De Felice F.G. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* 9: 191. 2015.
 39. Guan B., Hartmann B., Kho Y.H., Gorczyca M., Budnik V. The *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Curr Biol.* 6 (6): 695 – 706. 1996.
 40. Gunawardena S., Goldstein L.S. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron.* 32 (3): 389 – 401. 2001.
 41. Guo Q., Wang Z., Li H., Wiese M., Zheng H. APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell Res.* 22 (1): 78 – 89. 2012
 42. Hales K.G., Korey C.A., Larracuenta A.M., Roberts D.M. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics.* 201 (3): 815 – 842. 2015.
 43. Halpern M. E., Chiba A., Johansen J., Keshishian H. Growth cone behavior underlying the development of stereotypic synaptic connections in *Drosophila* Embryos. *J. Neurosci.* 11 (10): 3227 – 3238. 1991.
 44. Hamley I.W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective Role in Alzheimer's and Fibrillization. *Chem Rev.* 112 (10): 5147-5192. 2012.
 45. Harris K.P., Littleton J.T. Transmission, Development, and Plasticity of Synapses. *Genetics.* 201 (2): 345 – 375. 2015.
 46. Hirth F. *Drosophila melanogaster* in the study of Human Neurodegeneration. *CNS and Neurolog. Disorders.* 9: 504 – 523. 2010.
 47. Hoang B., Chiba A. Single – cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Developmental Biology.* 229: 55 – 70. 2001.
 48. Hui Ping Tan F., Azzam G. *Drosophila melanogaster*: Deciphering Alzheimer's Disease. *Malays J Med Sci.* 24 (2): 6 – 20. 2017.
 49. Jan L.Y., Jan Y.N. L-Glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J. Physiol.* 262: 215 – 236. 1976a.
 50. Jan L.Y., Jan Y.N. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J. Physiol.* 262 (1): 189 – 214. 1976b.

51. Jia X.-X., Gorczyca M., Budnik V. Ultrastructure of neuromuscular junction in *Drosophila*: comparison of wild type and mutants with increased excitability. *J. Neurobiol.* 24 (8): 1025 – 1044. 1993.
52. Joshi G., Bekier M.E. 2nd, Wang Y. Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 9: 340. 2015.
53. Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325 (6106): 733 – 736. 1987.
54. Karunanithi S., Marin L., Wong K., Atwood H. L. Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 22 (23): 10267 – 10276. 2002.
55. Kern J.V., Zhang Y.V., Kramer S., Brenman J.E., Rasse T.M. The Kinesin-3, Unc-104 Regulates Dendrite Morphogenesis and Synaptic Development in *Drosophila*. *Genetics.* 195 (1): 59 – 72. 2013.
56. Kim M.D., Wen Y., Jan Y.N. Patterning and Organization of Motor Neuron Dendrites in the *Drosophila* Larva. *Dev Biol.* 336 (2): 213 – 221. 2009.
57. Kohli B. M., Pflieger D., Mueller L. N., Carbonetti G., Aebersold R., Nitsch R. M. and Konietzko U. Interactome of the amyloid precursor protein APP in brain reveals a protein network involved in synaptic vesicle turnover and a close association with Synaptotagmin-1. *J. Proteome Res.* 11, 4075 – 4090. 2012.
58. Kotler S. A., Walsh P., Brender J. R., Ramamoorthy A. Differences between amyloid- β aggregation in solution and on the membrane: Insights towards elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev.* 43 (19): 6692 – 6700. 2014.
59. Laßek M., Weingarten J., Einsfelder Ulf, Brendel P., Müller U., Volkhardt W. Amyloid precursor proteins are constituents of the presynaptic active zone. *J. Neurochem.* 127. 48-56. 2013.
60. Lee L., Kosuri P., Arancio O. Picomolar Amyloid- β Peptides Enhance Spontaneous Astrocyte Calcium Transients. *J Alzheimers Dis.* 38 (1): 49 – 62. 2014.
61. Libeu C.A., Descamps O., Zhang Q., John V., Bredesen D.E. Altering APP Proteolysis: Increasing sAPP α Production by Targeting Dimerization of the APP Ectodomain. *PLoS One.* 7 (6): e40027. 2012.
62. Lloyd T.E., Taylor J.P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1184. 2010.

63. Long J.B., Van Vactor D. Embryonic and larval neural connectivity: progressive changes in synapse form and function at the neuromuscular junction mediated by cytoskeletal regulation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2 (6): 747 – 765. 2013.
64. Lucey B.P., Bateman R.J. Amyloid- β diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 35 Suppl 2: S29 – 34. 2014.
65. Masliah E., Mallory M., Hansen L., DeTeresa R., Alford M., Terry R. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 174: 67 – 72. 1994.
66. Mhatre S.D., Satyasi V., Killen M., Paddock B.E., Moir R.D., Saunders A.J., Marenda D.R. Synaptic abnormalities in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Dis Model Mech.* 7 (3): 373 – 385. 2014.
67. Nguyen K.V. The human β -amyloid precursor protein: biomolecular and epigenetic aspects. *BioMol Concepts.* 6 (1): 11 – 32. 2015.
68. Nguyen K.V., Leydiker K., Wang R., Abdenur J., Nyhan W.L. A Neurodevelopmental Disorder with a Nonsense Mutation in the Ox-2 Antigen Domain of the Amyloid Precursor Protein (APP) Gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 36 (5): 317 – 327. 2017.
69. Nhan H.S., Chiang K., Koo E.H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol.* 129 (1): 1 – 19. 2015
70. Nicolas M., Hassan B.A. Amyloid precursor protein and neural development. *Development.* 141 (13): 2543 – 2548. 2014.
71. Okado H., Okamoto H. A *Xenopus* homologue of the human beta-amyloid precursor protein: developmental regulation of its gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 189 (3): 1561 – 1568. 1992.
72. Paul M.M., Pauli M., Ehmann N., Hallermann S., Sauer M., Kittel R.J., Heckmann M. Bruchpilot and Synaptotagmin collaborate to drive rapid glutamate release and active zone differentiation. *Front Cell Neurosci.* 9: 29. 2015.
73. Pawlik M., Otero D.A., Park M., Fischer W.H., Levy E., Saitoh T. Proteins that bind to the RERMS region of β amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 355 (4): 907 – 912. 2007.
74. Pearson H.A., Peers C. Physiological roles for amyloid β peptides. *J Physiol.* 575 (Pt 1): 5 – 10. 2006.
75. Prokop A., Meinertzhagen I.A. Development and structure of synaptic contacts in *Drosophila*. *Cell Develop. Biol.* 17: 20 – 30. 2006.

76. Prüßing K., Voigt A., Schulz J.B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 8: 35. 2013.
77. Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 362: 329 – 344. 2010.
78. Reinhard C., Hébert S.S., De Strooper B. The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24 (23): 3996 – 4006. 2005.
79. Rodin D.I., Schwarzman A.L., Sarantseva S.V. Expression of human amyloid precursor protein in *Drosophila melanogaster* nerve cells causes a decrease in presynaptic gene mRNA levels. *Genet Mol Res.* 14 (3): 9225 – 9232. 2015.
80. Sadigh-Eteghad S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J. Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract.* 24 (1): 1 – 10. 2015.
81. Schulman V.K., Dobi K.C., Baylies M.K. Morphogenesis of the somatic musculature in *Drosophila melanogaster*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 4 (4): 313 – 334. 2015.
82. Seabrook G.R., Smith D.W., Bowery B.J., Easter A., Reynolds T., Fitzjohn S.M., Morton R.A., Zheng H., Dawso G.R., Sirinathsinghji D.J. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacol.* 38: 349 — 359. 1999.
83. Seifert B., Eckenstaler R., Röncke R., Leschik J., Lutz B., Reymann K., Lessmann V., Brigadski T. Amyloid-Beta Induced Changes in Vesicular Transport of BDNF in Hippocampal Neurons. *Neural Plast.* 2016: 4145708. 2016.
84. Selkoe D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol. Rev.* 81 (2): 741 – 766. 2001.
85. Senechal Y., Larmet Y., Dev K.K. Unraveling *in vivo* functions of amyloid precursor protein: Insights from knockout and knockdown studies. *Neurodegen. Dis.* 3: 134 – 147. 2006.
86. Stevens R.J., Akbergenova Y., Jorquera R.A., Littleton J.T. Abnormal Synaptic Vesicle Biogenesis in *Drosophila Synaptogyrin* Mutants. *J Neurosci.* 32 (50): 18054 – 18067. 2012.
87. Sun X., Chen W.D., Wang Y.D. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol.* 6: 221. 2015.
88. Sutcliffe B., Forero M.G., Zhu B., Robinson I.M., Hidalgo A. Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *PLoS One.* 8 (10): e75902. 2013.

89. Südhof T.C. The Presynaptic Active Zone. *Neuron*. 75 (1): 11 – 25. 2012.
90. Ting J.T., Kelley B.G., Lambert J.T., Cook D.G., Sullivan J. M. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Neurosci*. 104 (1): 353 – 358. 2007.
91. Torroja L., Packard M., Gorczyca M., White K., Budnik V. The *Drosophila* β -Amyloid Precursor Protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J. Neurosci*. 15: 7793 – 7803. 1999.
92. Tyan S.-H., Shih A. Y.-J., Walsh J.J., Maruyama H., Sarsoza F., Ku L, Eggert S., Hof P.R., Koo E.H., Dickstein D.L. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell. Neurosci*. 51: 43 – 52. 2012.
93. Ullah G., Demuro A., Parker I., Pearson J.E. Analyzing and Modeling the Kinetics of Amyloid Beta Pores Associated with Alzheimer's Disease Pathology. *PLoS One*. 10 (9): e0137357. 2015.
94. Umeda T., Ramser E. M., Yamashita M., Nakajima K., Mori H., Silverman M. A., Tomiyama T. Intracellular amyloid β oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons. *Acta Neuropathol Commun*. 3: 51. 2015.
95. Van Dam D., De Deyn P.P. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol*. 164: 1285 – 1300. 2011.
96. Van Vactor D., Sigrist S.J. Presynaptic Morphogenesis, Active Zone Organization and Structural Plasticity in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol*. 43: 119 – 129. 2017.
97. Vatteemi G., Nogalska A., King Engel W., D'Agostino C., Checler F., Askanas V. Amyloid-beta42 is preferentially accumulated in muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Acta Neuropathol*. 117 (5): 569 – 574. 2009.
98. Viquez N.M., Föger P., Valakh V., Daniels R.W., Rasse T.M., DiAntonio A. PP2A and GSK-3 β Act Antagonistically to Regulate Active Zone Development. *J Neurosci*. 29 (37): 11484 – 11494. 2009.
99. Völkner M., Lenz-Bohme B., Betz H., Schmitt B. Novel CNS glutamate receptor subunit genes of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurochem*. 75 (5): 1791 – 1799. 2000.
100. Wagh D.A., Rasse T.M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Dürrbeck H., Buchner S., Dabauvalle M.C., Schmidt M., Qin G., Wichmann C., Kittel R., Sigrist S.J., Buchner E. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron*. 49 (6): 833 – 844. 2006.

101. West R.J., Furmston R., Williams C.A., Elliott C.J. Neurophysiology of *Drosophila* Models of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2015: 381281. 2015.
102. Yang B., Sun X., Lashuel H., Zhang Y. Reactive oxidative species enhance amyloid toxicity in APP/PS1 mouse neurons. *Neurosci Bull.* 28 (3): 233 – 239. 2012.
103. Zhai R.G., Bellen H.J. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda).* 19: 262 – 270. 2004.
104. Zhang H., Ma Q., Zhang Y.W., Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 120 (Suppl 1): 9 – 21. 2012.
105. Zheng H., Koo E.H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration.* 1 (5): 1 – 12. 2006.
106. Zuo L., Hemmelgarn B.T., Chuang C.C., Best T.M. The Role of Oxidative Stress-Induced Epigenetic Alterations in Amyloid- β Production in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015: 604658. 2015.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю, профессору кафедры Общей физиологии СПбГУ, д.б.н. Игорю Ильичу Кривому.

Приношу искреннюю благодарность м.н.с. Екатерине Андреевне Сабуровой за помощь в освоении хирургических и иммуногистохимических методов, внимание к моей работе и поддержку.

Хочу поблагодарить заведующую лабораторией экспериментальной и прикладной генетики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, д.б.н. Светлану Владимировну Саранцеву за постоянные консультации и помощь при планировании, проведении и обсуждении работы.